

Untersuchungen zum anaeroben Toluol-Stoffwechsel in fakultativ und obligat anaeroben Bakterien



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sebastian Kölzer
aus Weilburg

Marburg/Lahn 2012

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juni 2008 bis März 2012 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Heider durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 28. November.2012 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. J. Heider
Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Buckel

Tag der mündlichen Prüfung am 04. Dezember 2012

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung	1
II. Summary	3
III. Einleitung	5
IV. Material und Methoden.....	4
1. Materialien.....	15
1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Gase	15
1.2 Chromatographiematerial.....	15
1.3 Kristallisationsmaterial.....	15
2. Stämme, Plasmide und synthetische Oligonukleotide	15
3. Medien und Puffer	21
3.1 Medien für die Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	21
3.2 Medien für die Kultivierung von <i>Desulfobacula toluolica</i> Stamm Tol2.....	27
3.3 Medien für die Kultivierung von <i>Geobacter metallireducens</i> Stamm GS-15	32
4. Kultivierung von Bakterien und Herstellung von Zellextrakten.....	35
4.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	35
4.2 Kultivierung von <i>D. toluolica</i> Stamm Tol2	35
4.3 Kultivierung von <i>G. metallireducens</i> Stamm GS-15.....	36
4.4 Anaerober Zellernte und Zellaufschluss.....	36
5. Molekularbiologische Methoden	38
5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	38
5.2 Reinigung von PCR-Produkten.....	39

5.3 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	39
5.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
5.5 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA.....	40
6. Klonierung	41
6.1 Kombinatorisches Klonen mit dem StarGate®-System (IBA)	41
6.2 Klonierung pET-16b-Vektoren.....	43
6.3 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	44
6.4 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	45
6.5 Sequenzierung von DNA.....	45
7. Biochemische Methoden	46
7.1 Heterologe <i>in-vivo</i> Expression Plasmid-kodierter Gene in <i>E. coli</i>	46
7.1.1 Überproduktion rekombinanter Gene durch Autoinduktion.....	46
7.1.2 Überproduktion rekombinanter Gene durch klassische Induktion.....	47
7.1.3 Überproduktion von L-Selenomethionin substituiertem ETF	47
7.2 Reinigung rekombinanter Proteine.....	48
7.2.1 Reinigung von Proteinen mit poly-Histidin-Tag.....	48
7.2.2 Reinigung von Proteinen mit Strep-Tag®	48
7.2.3 Reinigung der Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus <i>Thauera aromatica</i>	49
7.3 Konzentrierung von Proteinen	50
7.4 SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese	50
7.5 Isolierung des Kofaktors des ETF aus <i>G. metallireducens</i>	52
7.5.1 Denaturieren des ETF	52
7.5.2 Herstellung des Apoenzyms des ETF	52
7.6 Rekonstitution des ETF aus <i>G. metallireducens</i>	52
8. Chemische Methoden und Synthesen	53
8.1 Synthese von (<i>E</i>)-Phenylitaconat.....	53
8.2 Synthese von Benzylfumarat.....	54
8.3 Synthese von Benzylmaleat.....	55
8.4 Synthese von Coenzym-A- Thioestern	55

9. Enzymatische Tests	57
9.1 Aktivitätsbestimmung der (<i>R</i>)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase	57
9.1.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität der Hinreaktion	57
9.1.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität der Rückreaktion	58
9.2 Aktivitätsbestimmung des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins	58
9.3 Enzymassays zur Bifurkation von Elektronen	59
10. Analytische Methoden	59
10.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	59
10.2 Dünnschichtchromatographie	60
10.3 Colorimetrische Sulfidbestimmung (nach Cline, 1969)	60
10.4 Reversed-phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	61
11. Spektroskopische Methoden	62
11.1 UV/Vis Spektroskopie	62
11.2 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)	62
12. Spektrometrische Methoden	62
12.1 Massenspektrometrie	62
13. Proteinkristallisation und Strukturlösung	63
13.1 Proteinkristallisation des ETF aus <i>G. metallireducens</i>	63
13.2 Schwermetallsoaking der Kristalle des ETF	65
V. Ergebnisse	67
1. Enzyme der β-Oxidation von (<i>R</i>)-Benzylsuccinat	67
1.1 <i>in silico</i> Charakterisierung des <i>bss</i> - und <i>bbs</i> -Operons	67
1.1.1 Untersuchungen zum <i>bbs</i> -Operon	67
1.1.2 Sequenzierung des <i>bss</i> - und <i>bbs</i> -Operons aus <i>D. toluolica</i>	69
1.1.3 Untersuchungen zum OrfX (Gmet_1527) aus <i>G. metallireducens</i>	70

1.2 Chemische Synthese von Substraten	73
1.2.1 Chemische Synthese von (<i>E</i>)-Phenylitaconat	73
1.2.2 Chemische Synthese von Benzylsuccinyl-CoA und Phenylitaconyl-CoA	73
1.3 Charakterisierung der (<i>R</i>)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus <i>G. metallireducens</i>	76
1.3.1 Wachstum von <i>G. metallireducens</i> auf Toluol und Benzoat	76
1.3.2 Untersuchungen zur nativen (<i>R</i>)-Benzylsuccinyl-CoA DH aus <i>G. metallireducens</i>	79
1.3.3 Überproduktion und Reinigung der rekombinanten (<i>R</i>)-Benzylsuccinyl-CoA DH aus <i>G. metallireducens</i>	79
1.3.4 UV/Vis Spektroskopie der (<i>R</i>)-Benzylsuccinyl-CoA DH aus <i>G. metallireducens</i>	81
1.3.5 Photometrische Tests zur Bestimmung der Enzymaktivität der (<i>R</i>)-Benzylsuccinyl-CoA DH aus <i>G. metallireducens</i>	82
1.4 Charakterisierung der (<i>R</i>)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus <i>D. toluolica</i>	88
1.4.1 Wachstum von <i>D. toluolica</i> auf Toluol und Benzoat	88
1.4.2 Überproduktion und Reinigung der rekombinanten (<i>R</i>)-Benzylsuccinyl-CoA DH aus <i>D. toluolica</i>	89
1.4.3 Photometrische Tests zur Bestimmung der Enzymaktivität der (<i>R</i>)-Benzylsuccinyl-CoA DH aus <i>D. toluolica</i>	91
1.5 Charakterisierung der (<i>R</i>)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus <i>T. aromatica</i>	92
1.5.1 Überproduktion und Reinigung der rekombinanten (<i>R</i>)-Benzylsuccinyl-CoA DH aus <i>T. aromatica</i>	92
1.5.2 UV/Vis Spektroskopie der (<i>R</i>)-Benzylsuccinyl-CoA DH aus <i>T. aromatica</i>	94
1.5.3 Photometrische Tests zur Bestimmung der Enzymaktivität der (<i>R</i>)-Benzylsuccinyl-CoA DH aus <i>T. aromatica</i>	95
1.6 Charakterisierung des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus <i>G. metallireducens</i>	97
1.6.1 Überproduktion und Reinigung des rekombinanten ETF aus <i>G. metallireducens</i>	97
1.6.2 Untersuchungen zum Kofaktor des ETF aus <i>G. metallireducens</i>	99
1.6.3 Photometrische Tests zur Bestimmung der Enzymaktivität des ETF aus <i>G. metallireducens</i>	104
1.7 Charakterisierung des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus <i>D. toluolica</i>	105
1.7.1 Überproduktion und Reinigung des rekombinanten ETF aus <i>D. toluolica</i>	105
1.7.2 Untersuchungen zum Kofaktor des ETF aus <i>D. toluolica</i>	106
1.7.3 Photometrische Tests zur Bestimmung der Enzymaktivität des ETF aus <i>D. toluolica</i>	107

1.8 Charakterisierung des rekombinanten Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus <i>Aromatoleum aromaticum</i> Stamm EbN1	108
1.8.1 Überproduktion und Reinigung des rekombinanten ETF aus <i>A. aromaticum</i>	108
1.8.2 Untersuchungen zum Kofaktor des ETF aus <i>A. aromaticum</i>	109
1.8.3 Photometrische Tests zur Bestimmung der Enzymaktivität des ETF aus <i>A. aromaticum</i>	110
2. Potentielle Elektronen-Bifurkation in der Reaktion der (<i>R</i>)-Benzylsuccinyl-CoA DH	112
3. Kristallisation und Strukturaufklärung des ETF aus <i>G. metallireducens</i>	114
VI. Diskussion	118
VII. Literaturverzeichnis	129
VIII. Abkürzungsverzeichnis	139
IX. Anhang	141
Danksagung	143
Eidesstattliche Erklärung	144
Lebenslauf	145

I. Zusammenfassung

Die strikt anaeroben Deltaproteobakterien *Geobacter metallireducens* und *Desulfobacula toluolica* sind in der Lage Toluol als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen. Der Abbau von Toluol verläuft ähnlich wie in dem denitrifizierenden Organismus *Thauera aromatica*. Im initialen Schritt entsteht aus Toluol und Fumarat (*R*)-Benzylsuccinat, katalysiert durch das Enzym (*R*)-Benzylsuccinat Synthase. Der weitere Abbau von (*R*)-Benzylsuccinat erfolgt über eine modifizierte β -Oxidation bis hin zum zentralen Intermediat Benzoyl-CoA. In einem frühen Schritt dieser β -Oxidation wird (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA zu (*E*)-Phenylitaconyl-CoA oxidiert. An dieser Reaktion ist neben der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase (BbsG) auch ein Elektronen-Transferierendes Flavoprotein (EtfBA) beteiligt. Im Gegensatz zu fakultativ anaeroben Organismen, wie beispielsweise *T. aromatica*, sind in *G. metallireducens* und *D. toluolica* die Gene der beiden Untereinheiten des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins (*etfB* und *etfA*) im *bbs*-Operon (Beta-Oxidation von Benzylsuccinat) kodiert. Außerdem befindet sich dort ein weiteres Gen (*orfX*), welches offensichtlich für eine membranständige Oxidoreduktase mit zwei [4Fe-4S]-Clustern kodiert. Ziel dieser Arbeit war es, die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenasen mit ihren Elektronen-Transferierenden Flavoproteinen aus den verschiedenen Organismen zu charakterisieren.

1. Von den Organismen *G. metallireducens* und *D. toluolica* wurden Wachstumsparameter für das Wachstum auf Toluol und Benzoat bestimmt. *G. metallireducens* diente Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor und *D. toluolica* wuchs unter sulfatreduzierenden Bedingungen. Beide Organismen wuchsen auf Benzoat schneller als auf Toluol. Der Ertragskoeffizient (Y_m) für die jeweilige Kohlenstoff- und Energiequelle war jedoch nahezu gleich. Allgemein war die Verdopplungszeit von *G. metallireducens* deutlich kürzer als die von *D. toluolica*.

2. Die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenasen der Organismen *G. metallireducens*, *D. toluolica* und *T. aromatica* wurden heterolog in *E. coli* überproduziert, gereinigt und charakterisiert. Die Enzyme aus allen drei Organismen zeigten ähnliche apparente K_m - und V_{max} -Werte für die Hinreaktion, bei der Ferroceniumhexafluorophosphat als künstlicher Elektronenakzeptor und Benzylsuccinyl-CoA als Substrat diente. Die Rückreaktion der Enzyme mit reduziertem Methylviologen als Elektronendonator und Phenylitaconyl-CoA als Substrat verlief im Aktivitätstest jeweils deutlich schneller als die Hinreaktion. Für die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenasen aus *G. metallireducens* und *D. toluolica* war die spezifische Aktivität 25-mal höher und für das Enzym aus *T. aromatica* sogar 50-mal höher.

Weitere alternative Substrate konnten nicht identifiziert werden. Alle drei Enzyme besitzen einen Flavin-Kofaktor. Außerdem konnte im Zellextrakt von *G. metallireducens*, der auf Toluol angezogen wurde, die spezifische Aktivität der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase gemessen werden. Im Gegensatz dazu zeigte Zellextrakt von Zellen die auf Benzoat angezogen wurden keine Aktivität.

3. Die Elektronen-Transferierenden Flavoproteine der Organismen *G. metallireducens*, *D. toluolica* und *Aromatoleum aromaticum* wurde heterolog in *E. coli* überproduziert, gereinigt und charakterisiert. Für alle drei Enzyme wurden die apparenten K_m - und V_{max} -Werte bestimmt. Im photometrischen Assay diente Iodonitrotetrazolium als künstlicher Elektronenakzeptor und NADH als Substrat. Alle drei Enzyme besitzen eine Flavin-Kofaktor, welcher für das ETF aus *G. metallireducens* als FAD bestimmt werden konnte. Das Enzym besitzt ein Molekül FAD pro Heterodimer und zeigt nach Rekonstitution mit FMN keine Aktivität mehr im Assay.

4. Die rekombinanten ETFs wurden außerdem auf ihre Elektronen-bifurkierenden Eigenschaften getestet. Dabei wurde untersucht, ob die Enzyme in der Lage sind, in einer gekoppelten Reaktion Elektronen von NADH auf eine Acyl-CoA Dehydrogenase und auf Ferredoxin zu übertragen. Mit Hilfe der exergonen Reduktion von Phenylitaconyl-CoA mittels NADH würde die endergone Reduktion von Ferredoxin mittels NADH katalysiert. Diese Eigenschaft konnte bereits für das ETF aus *Acidaminococcus fermentans* gezeigt werden. Für die drei ETFs aus *G. metallireducens*, *D. toluolica* und *A. aromaticum* wurde jedoch gezeigt, dass sie keine bifurkierenden Eigenschaften besitzen.

Interessanterweise war es jedoch möglich, die (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *G. metallireducens* mit dem ETF aus *A. fermentans* zu kombinieren. Im photometrischen Assay wurde die Oxidation von NADH in Abhängigkeit von Phenylitaconyl-CoA und Ferredoxin gezeigt.

5. Das Protein OrfX aus *G. metallireducens* wurde *in-silico* charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich um ein membranständiges Protein mit mindestens fünf Transmembranhelices handelt, welches außerdem Bindemotive für zwei [4Fe-4S]-Cluster besitzt. Vermutlich werden durch dieses Enzym die Elektronen vom ETF auf Chinon übertragen.

6. Vom Elektronen-Transferierenden Flavoprotein aus *G. metallireducens* wurde die Struktur aufgeklärt. Dabei wurden sowohl die Röntgenstrukturdaten des nativen Enzyms als auch des Selenomethionin-substituierten Proteins verwendet. Das Enzym bindet ein Molekül FAD und ein Molekül AMP. Allgemein zeigt die Struktur eine sehr hohe Ähnlichkeit zu der des ETF aus *Paracoccus denitrificans*. Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem ETF aus *G. metallireducens* um ein nicht-bifurkierendes ETF handelt. Es ist der Gruppe I ETFs zuzuordnen, zu denen auch das humane ETF oder das ETF aus *P. denitrificans* gehören.

II. Summary

The strictly anaerobic Deltaproteobacteria *Geobacter metallireducens* and *Desulfobacula toluolica* are able to use toluene as sole energy- and carbon source. The degradation of toluene proceeds similar to that in the denitrifying organism *Thauera aromatica*. In the initial step (*R*)-benzylsuccinate is generated from toluene and fumarate which is catalyzed by the enzyme (*R*)-benzylsuccinate synthase. The further degradation of (*R*)-benzylsuccinate is carried out in a modified β -oxidation to the central intermediate benzoyl-CoA. In an early step of the β -oxidation (*R*)-benzylsuccinate is oxidized to (*E*)-phenylitaconyl-CoA. Beside the (*R*)-benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase (BbsG), there is also an electron transferring flavoprotein (EtfBA) involved. In contrast to facultative anaerobic organisms like *T. aromatica* for example, the genes *etfB* and *etfA* of the two subunits of the electron transferring flavoprotein of *G. metallireducens* and *D. toluolica* are coded in the *bbs*-operon (beta-oxidation of benzylsuccinate). Aim of this work was to characterize the electron transferring flavoprotein and the (*R*)-benzylsuccinate synthase from the corresponding organisms.

1. The growth parameter of *G. metallireducens* and *D. toluolica* were determined for the growth on toluene and benzoate. *G. metallireducens* used nitrate as terminal electron acceptor and *D. toluolica* was grown under sulfate reducing conditions. Both organisms did grow faster on benzoate than on toluene. The metabolic yield (Y_m) for each carbon- and energy source however was nearly identical. Overall the doubling time of *G. metallireducens* was considerably shorter than the one of *D. toluolica*.

2. The (*R*)-benzylsuccinyl-CoA dehydrogenases of *G. metallireducens*, *D. toluolica* and *T. aromatica* were heterologously expressed in *E. coli*, purified and characterized. All three enzymes showed similar apparent K_m - and V_{max} -values for the forward reaction, where ferrocium hexafluorophosphate was used as artificial electron acceptor and benzylsuccinyl-CoA served as substrate. The back reaction with reduced methylviologen as electron donor and phenylitaconyl-CoA as substrate proceeded in each case much faster than the forward reaction. The specific activity of the (*R*)-benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase from *G. metallireducens* and *D. toluolica* was 25 times higher and for the enzyme from *T. aromatica* even 50 times higher. Other alternative substrates could not be identified. All three enzymes contain a flavine cofactor. The cell free extract from *G. metallireducens* grown on toluene showed also specific activity of the (*R*)-benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase. In contrast no activity was measured in cell free extract from benzoate grown cells.

3. The electron transferring flavoproteins from *G. metallireducens*, *D. toluolica* and *Aromatoleum aromaticum* were heterologously expressed in *E. coli*, purified and characterized. The apparent K_m - and V_{max} -values for all three enzymes were determined. In the photometrical assay iodonitrotetrazolium was used as artificial electron acceptor and NADH served as substrate. All three enzymes contain a flavine cofactor, which was determined as FAD for the ETF from *G. metallireducens*. The enzyme contains one FAD per heterodimer and shows no activity after reconstitution with FMN.

4. The recombinant ETFs were also tested for their electron bifurcating properties. It was analyzed, if the enzymes were able to transfer electrons from NADH to an acyl-CoA dehydrogenase and ferredoxin in a coupled reaction. The exergonic reduction of phenylitaconyl-CoA with electrons from NADH could catalyze the endergonic reduction of ferredoxin with electrons from NADH. This principle was already proved for the ETF from *Acidaminococcus fermentans*. In contrast it could be shown, that the ETFs from *G. metallireducens*, *D. toluolica* and *Aromatoleum aromaticum* are not able to bifurcate electrons.

Interestingly it was possible to combine the (*R*)-benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase from *G. metallireducens* with the ETF from *A. fermentans*. The oxidation of NADH could be shown in dependence on phenylitaconyl-CoA and ferredoxin.

5. The protein OrfX from *G. metallireducens* was characterized *in-silico*. It could be shown that OrfX is a membrane protein with five transmembrane helices and two [4Fe-4S]-cluster motives. Possibly this enzyme catalyzes the electron transfer from the ETF to a quinone.

6. The crystal structure of the ETF from *G. metallireducens* was solved. For this purpose the x-ray data of the native enzyme were combined with the ones of the selenomethionine substituted protein. The enzyme binds one molecule of FAD and one molecule of AMP. Overall the enzyme structure is very similar to the one from *Paracoccus denitrificans*. The results show that this enzyme is a non-bifurcating ETF. It belongs to the group I ETFs, where also the human ETF or the ETF from *P. denitrificans* belongs.

III. Einleitung

Aromatische Kohlenwasserstoffe sind in der Natur weit verbreitet und spielen in vielen Gebieten des Lebens eine wichtige Rolle. So sind beispielsweise Lignine in vielen pflanzlichen Zellen eingelagert und bilden dort zusammen mit Cellulose und Hemicellulose die Lignocellulose, welche durch die sogenannte Verholzung (Lignifizierung) entsteht. Je nach Art machen Lignine zwischen 20 und 25% der Zelltrockenmasse aus und gehören mitunter zu den am weit verbreitetsten organischen Verbindungen (Kumar et al., 2008). Außerdem enthalten die Seitenketten von essentiellen Aminosäuren wie Tyrosin, Phenylalanin oder Tryptophan aromatische Reste oder lassen sich aromatische Kohlenwasserstoffe in sekundären Pflanzenstoffen wie beispielsweise Polyphenolen oder Xanthonen finden. Hier dienen sie als Farb- und Geschmacksstoffe, spielen aber auch in der Medizin und Pharmakologie eine wichtige Rolle (Pinto et al., 2005).

Eine weitere Quelle aromatischer Verbindungen sind die fossilen Brennstoffe wie Kohle, Erdgas oder Erdöl, welche im Laufe von Jahrmillionen in unvorstellbaren Mengen entstanden sind. Bereits vor der industriellen Gewinnung von Rohöl, beispielsweise in Deutschland im Jahre 1856 oder den USA 1859, gelangte dieses auf natürlichem Weg an die Erdoberfläche und stellte so ein Problem für die belebte Natur dar. Doch erst im Zuge der kommerziellen Gewinnung entwickelten sich diese Mineralölkohlenwasserstoffe immer stärker zu einer der bedeutendsten Schadstoffe unserer Umwelt. Neben der Lagerung und dem Transport mit Hilfe von Tankern oder Pipelines, bei dem in den vergangenen Dekaden zahlreiche Unfälle dafür sorgten, dass ungewollt gigantische Mengen von aromatischen Kohlenwasserstoffen in die Natur gelangten und dort enormen Schaden anrichteten (Gill et al., 2012), sorgten in den letzten Jahren die Förderung von Rohöl in der Tiefsee durch Ölplattformen für katastrophale Verschmutzung von Meer und Land (White et al., 2012). Aufgrund ihrer chemischen Struktur sind aromatische Kohlenwasserstoffe eine besondere Form von Umweltgiften. Neben der hohen Toxizität und karzinogenen Eigenschaft vieler aromatischer Verbindungen stellt insbesondere die hohe Persistenz dieser Stoffe eine große Gefahr dar.

In diesem Zusammenhang gewinnt die Bioremediation immer mehr an Bedeutung. Neben Pflanzen und Pilzen spielen bei der biologischen Sanierung von Bereichen, welche durch mono- und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe kontaminiert sind, Prokaryoten eine wichtige Rolle (Bamfoth und Singleton, 2005). Diese sind beispielsweise im Boden in einer Vielzahl vorhanden und in der Lage, die Verunreinigungen durch enzymatische Reaktionen abzubauen. Dabei muss neben dem aeroben Abbau dieser Schadstoffe durch Mono- und Dioxygenasen (Andreoni und Gianfreda, 2007) besonders der anaerobe Abbau ins Auge gefasst werden, da die Verschmutzungen oftmals in

anoxische Bereiche des Erdreichs vordringen. Die Grundlagen des anaeroben Abbaus von aromatischen Kohlenwasserstoffen sind in der Wissenschaft noch nicht allzu lange bekannt, wurden in den letzten Jahrzehnten jedoch immer besser verstanden und genauer charakterisiert (Rabus und Widdel, 1995; Rabus und Heider, 1998; Spormann und Widdel, 2000; Widdel und Rabus, 2001; Rabus et al., 2005). Mit diesem Verständnis des anaeroben Metabolismus der Mikroorganismen und der daran beteiligten Enzyme lassen sich in Zukunft möglicherweise Prozesse der Bioremediation besser steuern.

Kohlenwasserstoffe

Kohlenwasserstoffe stellen eine äußerst vielfältige Stoffgruppe dar, wobei man grundsätzlich zwischen aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen unterscheidet. Erstere unterteilt man wiederum in zyklische und azyklische aliphatische Kohlenwasserstoffe, wobei im Gegensatz zu aromatischen Verbindungen kein konjugiertes Doppelbindungssystem vorhanden ist.

In dieser Arbeit liegt das Augenmerk auf den aromatischen Kohlenwasserstoffen und im Besonderen auf dem Alkylbenzol Toluol, bei dem der aromatische Benzolring mit einer Methylgruppe substituiert ist. Neben Benzol, Ethylbenzol und den drei isomeren Formen des Xylols, zählt auch Toluol zur sogenannten BTEX-Gruppe (Abb. 1), die als Rohstoffe in der Petrochemie eine wichtige Rolle spielen aber auch aufgrund ihrer gesundheitsschädlichen und krebserregenden Eigenschaften von ökologischer Bedeutung sind. Sie können leicht über Haut oder Atmungsorgane aufgenommen werden und reichern sich aufgrund ihres lipophilen Charakters im Fettgewebe an. Im Menschen können sie Nerven-, Nieren- und Leberschäden verursachen, außerdem ist von Benzol bekannt, dass es im Körper zu Epoxid oxidiert wird und dieses unter anderem das Erbgut schädigen kann. Aus ökonomischer Sicht nutzt man diese Stoffe als Lösemittel, sie bilden aber ebenso die Grundlage für die Herstellung von Kunststoffen, Agrochemikalien oder Arzneimitteln.

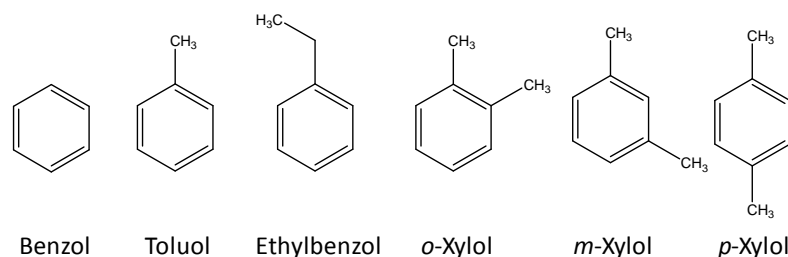


Abb. 1: Aromatische Kohlenwasserstoffe der BTEX-Gruppe. Der Abkürzung BTEX ergibt sich aus den Anfangsbuchstaben von **B**enzol, **T**oluol, **E**thylbenzol und **X**ylol.

Aerober Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen

Viele Bakterien und Pilze sind in der Lage aromatische Kohlenwasserstoffe unter aeroben Bedingungen abzubauen. Pilze zersetzen beispielsweise Lignine durch die sogenannte Weißfäule, bei der entsprechende Enzyme und Glyoxal exozytotisch abgegeben werden und die Ligninverbindungen letztendlich durch Radikalreaktionen unter Beteiligung von Mangan depolymerisiert und abgebaut werden. Prokaryoten verwenden für den aeroben Abbau von Kohlenwasserstoffen Mono- oder Dioxygenasen und den molekularen Sauerstoff der Luft, um in einer Hydroxylierungsreaktion das Substrat zu aktivieren. Im Anschluss erfolgt die Ringspaltung in *ortho*- oder *meta*-Position durch Dioxygenasen (Harwood und Parales, 1996).

Anaerober Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen

Bereits zur Mitte des 20. Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass der anaerobe Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen in methanogenen Konsortien stattfindet (Clark und Fina, 1952). Zwanzig Jahre später wurde dies auch für denitrifizierende Bakterien gezeigt (Taylor und Heeb, 1971). Im Laufe der letzten zweieinhalb Dekaden wurde der anaerobe Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen intensiv erforscht und dadurch besser Verstanden. Zum heutigen Tag ist eine Vielzahl von denitrifizierenden-, Eisen(III)-reduzierenden und sulfatreduzierenden Bakterien bekannt, die beispielsweise Toluol oder Ethylbenzol als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Einen großen Teil davon machen die denitrifizierenden, fakultativ anaeroben Organismen der Gattung *Thauera* und *Azoarcus* aus, die zu den Betaproteobakterien gehören. Wichtige obligat anaerobe Vertreter zählen zu den Gattungen *Geobacter* und *Desulfobacula* (Rabus und Widdel, 1995; Lovley und Lonergan, 1990). *Geobacter metallireducens* ist ein Eisen(III)-reduzierendes Bodenbakterium welches zu den Deltaproteobakterien gehört und unter anderem Toluol vollständig zu CO₂ oxidiert. Allgemein spielen *Geobacter* Spezies bei der Bioremediation eine wichtige Rolle, da sie nicht nur aromatische Verbindungen Abbauen können, sondern es auch Vertreter gibt, die Uran als terminalen Elektronenakzeptor nutzen (Lovley et al., 1991). Dabei wird wasserlösliches Uran(VI) mit Hilfe von Proteinfilamenten, sogenannten Nanowires, zu unlöslichem Uran(IV) reduziert (Cologgi et al., 2011). *Desulfobacula toluolica* ist ein wichtiger Vertreter sulfatreduzierender Deltaproteobakterien, der in der Lage ist, Toluol unter strikt anaeroben Bedingungen vollständig zu CO₂ zu oxidieren (Rabus et al. 1993). Dabei dient Sulfat als terminaler Elektronenakzeptor, welches vom Organismus schrittweise zu Schwefelwasserstoff reduziert wird. Das natürliche Habitat dieser Bakterien sind marine Sedimente, da hier anoxische Bedingungen herrschen und außerdem eine ausreichend hohe Sulfat-Konzentration zu erwarten ist.

Anaerober Abbau von Toluol: (R)-Benzylsuccinat Synthase

Der initiale Schritt des anaeroben Toluolabbaus ist die stereospezifische Addition der Methylgruppe des Toluols an die Doppelbindung eines Fumarat Kosubstrates durch das Enzym (R)-Benzylsuccinat Synthase (Leuthner et al., 1998). Dabei handelt es sich um ein Glycyl-Radikalenzym, dessen Reaktion eine bis dahin unbekannte biochemische Funktionsweise darstellt. (R)-Benzylsuccinat konnte bereits früh als Metabolit des anaeroben Toluolabbaus von sulfatreduzierenden Anreicherungskulturen beobachtet werden (Beller et al., 1992). Der Beweis, dass es sich um das Produkt aus Toluol und Fumarat handelt, gelang durch Untersuchungen am denitrifizierenden Bakterium *Thauera aromatica* (Biegert et al., 1996). Ähnliche Ergebnisse konnten ebenso für andere Organismen wie *G. metallireducens* (Kane et al., 2002) und *Azoarcus sp.* (Beller und Spormann, 1999) gezeigt werden. In den vergangenen Jahren wurde die (R)-Benzylsuccinat Synthase aus *T. aromatica* eingehend untersucht und als Modell für viele andere Glycyl-Radikalenzyme, die analoge Fumarat-Additionsreaktion katalysieren, etabliert (Leuthner et al., 1998; Hermuth et al., 2002;). Zu weiteren bekannten Vertretern der Glycyl-Radikalenzym Familie zählen unter anderem die Pyruvat-Formiat-Lyase (Knappe et al., 1984), die anaerobe Ribonukleotid Reduktasen (Sawers und Watson, 1998), die Coenzym B12-unabhängige Glycerin Dehydratase (Raynaud et al., 2003) sowie die *p*-Hydroxy-Phenylacetat Decarboxylase aus *Clostridium difficile* (Selmer und Andrei, 2001). Die Enzyme der drei erstgenannten Vertreter bestehen aus einer großen Untereinheit, die *p*-Hydroxy-Phenylacetat Decarboxylase besitzt eine zusätzliche kleine Untereinheit und die Benzylsuccinat Synthase besteht neben der großen Untereinheit aus zwei weitere kleine Untereinheiten. Die große Untereinheit ist bei allen Vertretern konserviert und trägt das Glycyl-Radikal, die genaue Funktion der kleinen Untereinheiten ist bis heute nicht klar. Bekannt ist aber, dass die kleinen Untereinheiten der (R)-Benzylsuccinat Synthase je ein konserviertes Cystein-Motiv besitzen und offensichtlich jeweils ein Eisen-Schwefel-Cluster koordinieren (Feil, 2006; Hilberg, 2012). Die apparente Molekülmasse der (R)-Benzylsuccinat Synthase aus *T. aromatica* beträgt 220 kDa und setzt sich aus den Untereinheiten α (98 kDa), β (8,5 kDa) und γ (6,4 kDa) zusammen, welche vermutlich ein Heterohexamer bilden ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$).

Die (R)-Benzylsuccinat Synthase wird durch die Gene *bssCAB* codiert, die im *bss*-Operon codiert sind (vgl. Abb. 2). Neben den Genen für die drei Untereinheiten, sind im *bss*-Operon weitere Gene lokalisiert. Dazu zählt unter anderem das Gen *bssD*, welches für das aktivierende Enzym der (R)-Benzylsuccinat Synthase codiert. Wie alle anderen bekannten Glycyl-Radikalenzyme wird auch die (R)-Benzylsuccinat Synthase posttranslational durch das aktivierende Enzym in die katalytisch aktive Form überführt. Es handelt es sich um ein S-Adenosylmethionin-Radikal-Enzym (SAM-Radikal-Enzym) mit einem ungewöhnlich koordinierten [4Fe4S]-Cluster im aktiven Zentrum. Statt einem vierten

Cystein wird das Kosubstrat S-Adenosylmethionin (SAM) gebunden und zur Generierung des Glycylradikals verwendet. Dabei wird bei der Bindung des Kosubstrats an den Eisen-Schwefel-Cluster ein Elektron auf SAM übertragen und dieses dadurch homolytisch gespalten. Neben Methionin resultiert daraus ein S-Adenosylradikal, welches dann das Glycylradikal im aktiven Zentrum der (R)-Benzylsuccinat Synthase generiert. Neben den bereits erwähnten Genen des *bss*-Operons, finden sich in den Genomen mancher Organismen weitere Gene (*bssEFGH*). Diese werden zusammen mit den Genen *bssDCAB* kotranskribiert und sind möglicherweise ebenfalls am initialen Schritt des anaeroben Toluolabbaus beteiligt (Hermuth et al., 2002; Leuthner et al., 1998).

Anaerobe Oxidation von (R)-Benzylsuccinat

Der weitere Abbau des (R)-Benzylsuccinat erfolgt über eine modifizierte β -Oxidation zum Benzoyl-CoA (Leutwein und Heider, 1999; Leuthner und Heider, 2000; Leutwein und Heider, 2001; Lippert, 2009), einem zentralen Intermediat im anaeroben Abbau zahlreicher aromatischer Verbindungen (Harwood et al., 1999). Die Gene aller beteiligten Enzyme sind im sogenannten *bbs*-Operon codiert, dabei steht *bbs* für beta-Oxidation von Benzylsuccinat (vgl. Abb. 2). Vergleicht man diese aus unterschiedlicher Organismen miteinander zeigt sich, dass es einerseits Unterschiede in der Anordnung der Gene im Operon gibt und andererseits in der Anzahl der Gene. Im *bss*-Operon aus obligat anaeroben Organismen wie *G. metallireducens* oder *D. toluolica* befinden sich neben den bekannten Genen aus *T. aromatica* (vgl. Abb. 2) drei zusätzlich Gene. Dabei handelt es sich um die beiden Gene *etfB* und *etfA*, welche für die beiden Untereinheiten eines Elektronen transferierenden Flavoproteins (ETF) codieren und einem Gen mit der Bezeichnung *orfX*, dessen Genprodukt weitgehend unbekannt ist. Untersuchungen der Primärstruktur dieses Proteins zeigen, dass es sich um ein Membranprotein handelt.

Im ersten Schritt des β -Oxidationswegs wird Benzylsuccinat durch die Succinyl-CoA:(R)-Benzylsuccinat-CoA-Transferase (BbsEF) zu (R)-Benzylsuccinyl-CoA aktiviert. Dieses Enzym wurde bereits in *T. aromatica* eingehend untersucht (Leutwein und Heider, 1999; Leutwein und Heider, 2001) und besteht aus zwei Untereinheiten mit einer Molekülmasse von 44 kDa und 45 kDa die in der aktiven Form ein Heterotetramer aus $\alpha_2\beta_2$ bilden (Leutwein und Heider, 1999; Leutwein und Heider, 2001). Das Enzym gehört zu einer neuen Familie von Co-Transferasen (Familie III) und ihr Reaktionsmechanismus unterscheidet sich grundlegend von dem der Co-Transferasen aus Familie I (Heider, 2001). Die Reaktion läuft nicht über einen Ping-Pong-Mechanismus ab, sondern es kommt zur Bildung eines ternären Komplexes zwischen Enzym und Substrat.

Im Anschluss wird dann (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA durch die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase (BbsG) zu (*E*)-Phenylitaconyl-CoA oxidiert (Leutwein und Heider, 2001). Das Enzym aus *T. aromatica* wurde bereits funktionell in *E. coli* überproduziert, gereinigt und charakterisiert (Leutwein und Heider, 2002). Es besitzt ein Flavinmolekül als Kofaktor, hat eine apparente Masse von 45 kDa und liegt als Homotetramer vor (Leutwein, 2000). Die Elektronen aus der Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA werden vermutlich auf ein ETF übertragen. Aufgrund der zusätzlichen Gene, die unter anderem für ein ETF kodieren, sind in diesem Schritt möglicherweise Unterschiede zwischen fakultativ anaeroben denitrifizierenden Organismen und obligat anaeroben Eisen(III)- und Sulfat-reduzierenden Organismen zu erwarten. Es könnte sich bei dem Elektronen transferierenden Flavoprotein um eine spezielle Form handeln, welches die Elektronen auf das bereits oben erwähnte Membranprotein (OrfX) überträgt.

Anschließend wird (*E*)-Phenylitaconyl-CoA durch die Phenylitaconyl-CoA Hydratase (BbsH) zu 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA umgesetzt (Feil, 2006; Lippert, 2009). In *T. aromatica* besitzt das Enzym eine apparente Masse von 28 kDa und liegt als Homotetramer vor (Lippert, 2008).

Im vorletzten Schritt wird 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA durch die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase (BbsCD) zu Benzoylsuccinyl-CoA oxidiert (Lippert, 2008). Dabei dient NAD^+ als Kosubstrat, welches zu NADH reduziert wird. Das Enzym setzt sich aus zwei Untereinheiten mit den apparenten Massen von 26 kDa (BbsC) und 28 kDa (BbsD) zusammen, die in der aktiven Form ein Heterodimer ($\alpha\beta$) bilden (Lippert, 2008). Das Enzym besitzt keine Kofaktoren.

Benzoylsuccinyl-CoA wird im letzten Schritt thiolytisch zum zentralen Intermediat Benzoyl-CoA und dem CoA-Donor Succinyl-CoA gespalten. Diese Reaktion wird durch eine β -Ketothiolase, die Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase (BbsAB) katalysiert (Lippert, 2008). Das Protein besteht aus zwei Untereinheiten mit apparenten Massen von 41 kDa (BbsB) und 16 kDa (BbsA) und bildet im aktiven Zustand ein Heterotetramer ($\alpha_2\beta_2$) (Lippert, 2008).

Der weitere Abbau von Benzoyl-CoA in fakultativ anaeroben Organismen wie *T. aromatica* findet durch eine ATP-abhängige Benzoyl-CoA Reduktase statt (Boll und Fuchs, 1995; Boll et al., 2000). Im Gegensatz dazu unterscheidet sich der Abbau von Benzoyl-CoA in obligat anaeroben Organismen wie *Desulfococcus multivorans* oder *G. metallireducens* (Boll, 2005). In *G. metallireducens* konnte gezeigt werden, dass hier eine ATP-unabhängige Benzoyl-CoA Reduktase vorhanden ist, die neben Eisen-Schwefel-Clustern auch Wolfram enthält (Wischgoll et al., 2005; Kung et al., 2009).

Das entstehende Succinat wird durch die Succinat Dehydrogenase zu Fumarat oxidiert, welches der (R)-Benzylsuccinat Synthase dann wieder als Kosubstrat zur Verfügung steht.

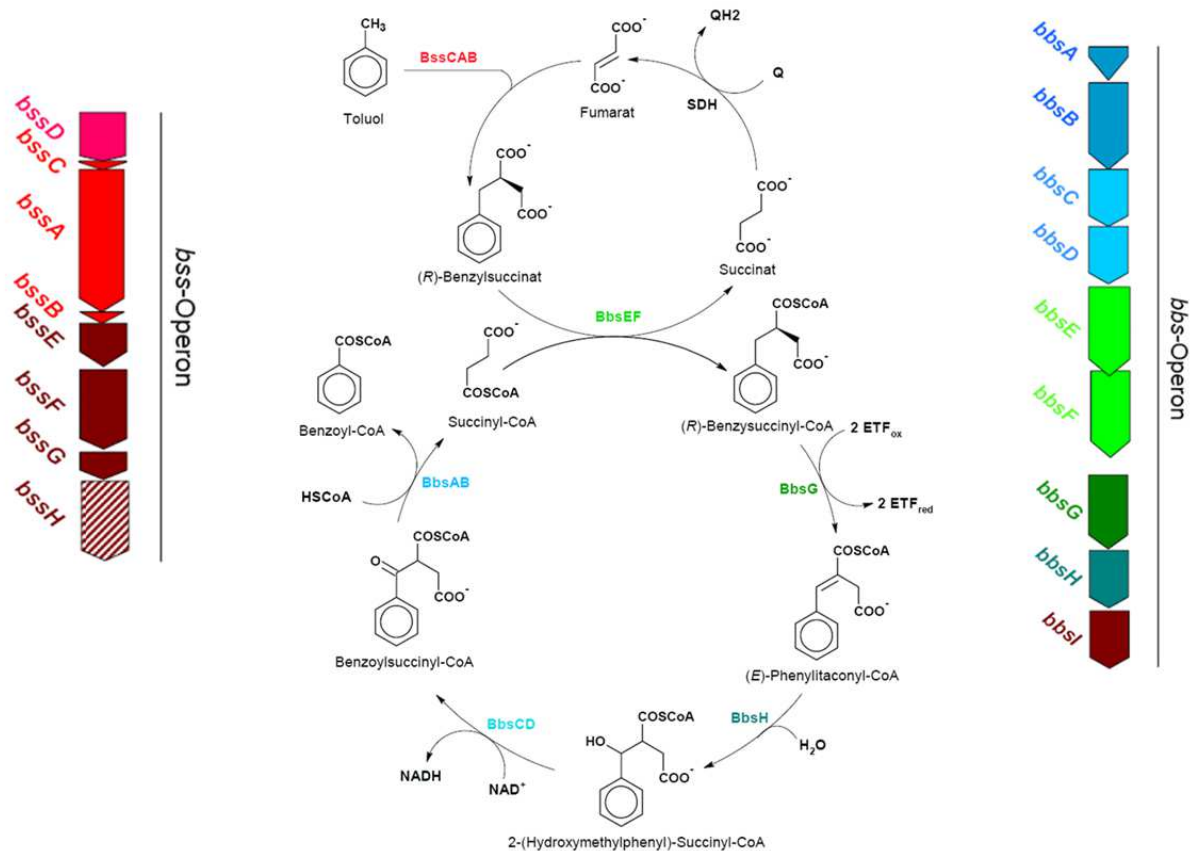


Abb. 2: Abbau von Toluol am Beispiel von *T. aromatica*. Im *bss*-Operon sind die Gene für den initialen Schritt des Toluolabbaus codiert. Die (*R*)-Benzylsuccinat Synthase (BssCAB) katalysiert nach ihrer Aktivierung durch das aktivierende Enzym (BssD) die Addition der Methylgruppe an die Doppelbindung des Fumarats. Das Produkt dieser Reaktion ist (*R*)-Benzylsuccinat. Das *bbs*-Operon codiert die Gene für den weiteren Abbau des (*R*)-Benzylsuccinat über eine modifizierte β -Oxidation. Die beteiligten Enzyme sind Succinyl-CoA:(*R*)-Benzylsuccinat CoA-Transferase (BbsEF), (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase (BbsG), Phenylitaconyl-CoA Hydratase (BbsH), 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase (BbsCD), Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase (BbsAB) und Succinat Dehydrogenase (SDH).

Elektronen-Transferierende Flavoproteine (ETF)

Elektronen-Transferierende Flavoproteine sind lösliche heterodimere Proteine, die Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als Kofaktor besitzen. Sie sind ubiquitär in der belebten Natur zu finden und spielen in vielen Stoffwechselwegen eine wichtige Rolle. Dabei dienen sie unter anderem als

Elektronenüberträger zwischen Dehydrogenasen und Membranproteinen der Atmungskette. Ebenso gibt es aber auch ETFs, denen NADH oder Ferredoxin als Elektronendonator dient. Davon besitzen manche die Fähigkeit, mittels Bifurkation von Elektronen Energie zu konservieren. Dies stellt neben der Substratstufenphosphorylierung und einem elektrochemischen Protonengradienten eine neue Form der Energiekonservierung dar (Herrmann et al., 2008).

Allgemein kann man die Elektronen-Transferierenden Flavoproteine in drei Gruppen einteilen (Toogood et al., 2007). Zur ersten Gruppe gehören die gut untersuchten ETFs aus Säugetieren und manchen Bakterien. Sie sind am Fettsäureabbau beteiligt und übertragen dort beispielsweise Elektronen von einer flavinhaltigen Acyl-CoA Dehydrogenase auf eine membrangebundene ETF: Ubichinon Oxidoreduktase (ETFQO) (Goodman et al., 1994). Ein weiteres Beispiel dieser Gruppe ist das ETF aus *Paracoccus denitrificans*, das Elektronen von einer Glutaryl-CoA Dehydrogenase, Butyryl-CoA Dehydrogenase oder Octayl-CoA Dehydrogenase auf eine ETFQO überträgt (Husain und Steenkamp, 1985).

Zur zweiten Gruppe kann man die ETFs zählen, die homolog zu den Enzymen FixB und FixA sind (Arigoni et al., 1991). Diese stammen aus stickstofffixierenden und diazotrophen Organismen und sind dort am Elektronentransport zur Nitrogenase beteiligt (Edgren und Nordlund, 2006). Im Gegensatz zu den Vertretern aus Gruppe I sind diese ETFs in der Lage, Elektronen von NADH oder Ferredoxin aufzunehmen und auf Dehydrogenasen zu übertragen und. Diese sind ausschließlich in anaeroben Bakterien zu finden (Herrmann et al., 1998). Das ETF aus *Megasphaera elsdenii* ist beispielsweise in der Lage, mit Hilfe der Elektronen aus der Oxidation von NADH eine Butyryl-CoA Dehydrogenase zu reduzieren (Brockman und Wood, 1975). Außerdem findet sich bei diesem Enzym statt des üblicherweise vorhandenen AMP ein zweites Molekül FAD (Pace und Stankovich, 1986; Sato et al., 2003). Eine neue Art stellen die elektronenbifurkierenden ETFs dar, die ebenfalls in anaeroben Bakterien vorkommen. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine neue Gruppe von ETFs, da sie zwar Ähnlichkeiten, aber auch gravierende Unterschiede zu den oben erwähnten ETFs aus Gruppe II aufweisen. Beispiele dafür sind die ETFs aus *Clostridium kluyveri* oder *Clostridium tetanomorphum* (Li et al., 2007; Herrmann et al., 2008). Diese bilden zusammen mit einer Butyryl-CoA Dehydrogenase einen stabilen Komplex, welcher die bifurkierende Reaktion katalysiert. Dabei wird die exergone Reduktion von Crotonyl-CoA mittels NADH an die endergone Reduktion von Ferredoxin mittels NADH gekoppelt (Herrmann et al., 2008). Beide FAD des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins scheinen für die Bifurkation eine entscheidende Rolle zu spielen. Interessanterweise katalysieren die Butyryl-CoA Dehydrogenase und das ETF aus *Acidaminococcus fermentans* die gleiche Reaktion, beide bilden aber keinen stabilen Komplex zusammen (Wohlfarth und Buckel, 1985).

Zur dritten Gruppe zählen die Proteine YaaQ und YaaR aus *E. coli*. Diese sind entfernte Verwandte der Proteine der anderen beiden Gruppen und ihre Gene liegen benachbart zum *cai*-Operon (Tsai und Saier, 1995). Möglicherweise sind YaaQ und YaaR am Carnitin-Metabolismus beteiligt, da die Gene des *cai*-Operons durch Carnitin induziert werden. Aus wissenschaftlicher Sicht spielen die beiden Proteine eine untergeordnete Rolle und sind nicht weiter charakterisiert.

Strukturell kann man ETFs in drei Domänen einteilen (Roberts et al, 1998). Dabei besteht die α -Untereinheit aus den Domänen I und II. Der Amino-Terminus der α -Untereinheit (EtfA) stellt die Domäne I dar. Sie bindet keinen Kofaktor sondern bildet einen flexiblen Bereich, der über eine Art Gelenk mit der Domäne II verbunden ist. Der Carboxy-Terminus der α -Untereinheit (EtfA) trägt die FAD-Bindestelle und bildet die Domäne II. Das Flavinmolekül ist nicht kovalent an das Enzym sondern in einer Art Spalte zwischen Domäne II und Domäne III gebunden. Beim Vergleich der Primärstruktur diverser ETFs zeigt sich eine hohe Sequenzidentität. Konservierte Aminosäuren interagieren mit dem Isoalloxazin-Ring, dem Ribityl-Rest und dem AMP des FAD und sorgen für zusätzliche Bindung des Moleküls an das Enzym. Die gesamte β -Untereinheit (EtfB) bildet die Domäne III und bindet ein Molekül Adenosinmonophosphat (AMP). Die genaue Funktion dieses AMP ist nicht bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass es auf die katalytischen Eigenschaften keinen Einfluss hat, scheinbar aber für die Interaktion der Untereinheiten bei der Bildung des Holoenzym eine Rolle spielt (Chohan et al., 2001; Sato et al., 2003).

Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des anaeroben Toluol-Abbaus im sulfatreduzierenden Bakterium *Desulfobacula toluolica* und im eisenreduzierenden Bakterium *Geobacter metallireducens* und diese mit dem von fakultativ anaeroben Organismen wie *Thauera aromatica* oder *Aromatoleum aromaticum* verglichen werden. Der Fokus lag dabei auf der biochemischen Charakterisierung der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenasen und den Elektronen-transferierenden Flavoproteinen der entsprechenden Organismen. Dabei sollte insbesondere die Rolle der Enzyme am Energiestoffwechsel der Bakterien untersucht werden. Des Weiteren sollten auch *in-silico* Untersuchungen dabei helfen, den anaeroben Toluol-Abbau besser zu verstehen.

IV. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Gase

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Alpha Aesar (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase und Polymerasen wurden von der Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt) und Thermo Scientific (Dreieich) bezogen; Desoxyribonuklease und Ribonuklease stammten von der Firma Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) synthetisiert.

Die verwendeten Gase Stickstoff (99,9 %), Aligal 12 (20% Kohlenstoffdioxid, 80% Stickstoff) und Formiergas F5 (95 % Stickstoff, 5 % Wasserstoff) wurden von der Firma Airliquide (Düsseldorf) und Praxair (Düsseldorf) geliefert.

1.2 Chromatographiematerial

Material und Zubehör zur Reinigung rekombinanter Proteine mittels Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie oder Größenausschlusschromatographie wurde von GE Healthcare (Freiburg) und IBA (Göttingen) bezogen.

1.3 Kristallisationsmaterial

Die für die Kristallisation verwendeten Materialien und Lösungen stammten von Qiagen (Hilden), Greiner Bio One (Solingen) und Hampton Research (Aliso Viejo, Ca).

2. Stämme, Plasmide und synthetische Oligonukleotide

Eine Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme gibt Tabelle 1, Plasmide und synthetische Oligonukleotide sind in den Tabellen 2, 3, 4 und 5 zusammengefasst.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme

Bakterium	Genotyp	Referenz
<i>Desulfobacula toluolica</i> Stamm Tol2	Wildtyp DSM 7467	Rabus et al., 1993
<i>Geobacter metallireducens</i> Stamm GS-15	Wildtyp DSM 7210	Lovley et al. 1995
<i>Thauera aromatica</i> Stamm K172	Wildtyp DSM 6984	Tschech und Fuchs 1987
<i>Aromatoleum aromaticum</i> Stamm EbN1	Wildtyp	Rabus und Widdel 1995
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA- argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ -	Woodcock et al. 1989
<i>Escherichia coli</i> Rosetta (DE3)pLysS	F ⁻ ompT hsdS _B (R _B ⁻ m _B ⁻) galdcm λ (DE3 [lacI lacUV5T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam ^R)	Novagen

Tab. 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp	Protein-Tag	Referenz
pET-16b	Amp ^R	poly-Histidin-Tag	Novagen, 1998
pE ENTRY-IBA20	Kan ^R	kein Tag	IBA GmbH
pTrc99A	Amp ^R	kein Tag	Amann et al., 1988
pASG-IBA3	Amp ^R	Strep-Tag®	IBA GmbH
pASG-IBA3_EtfBA_Dtol	Amp ^R	Strep-Tag®	diese Arbeit
pET-16b_EtfBA_Gmet	Amp ^R	poly-Histidin-Tag	diese Arbeit
pET-16b_EtfBA_EbN1	Amp ^R	poly-Histidin-Tag	diese Arbeit
pET-16b_BbsG_Gmet	Amp ^R	poly-Histidin-Tag	diese Arbeit
pTrc99A_BbsG_Taro	Amp ^R	kein Tag	Doktorarbeit B. Leuthner, 1999
pASG-IBA3_BbsG_Dtol	Amp ^R	Strep-Tag®	diese Arbeit

Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
bbsG1_tol_s	5'-aagctcttcaatggatttagtatactgaagaatatatgatgtg-3'
bbsG1_tol_as	5'-aagctcttcacccatttcttcagtactacaataaatggattatagg-3'
bbsG_Gmet_s	5'-ggccggcatatggattcagcatacccg-3'
bbsG_Gmet_as	5'-ggccggggatcctcactcctcgtcggc-3'
GmEtfBNdefor	5'-ggccggcatagcagatagtcgtcttggc-3'
GmEtfABamrev	5'-gccatagctgatattccag-3'
etfBA_EbN1_pET16b_s	5'-ggccggcatatgaagatcctcgtagccggttaagcgcgtgg-3'
etfBA_EbN1_pET16b_as	5'-ggccggagatctgcctaccgcttggtcagctcgg-3'
etfBA_Dtol_s	5'-aagctcttcaatgcatattgcggtattagcaaag-3'
etfBA_Dtol_as	5'-aagctcttcacccttaccctccataatcgct-3'
Gmet_1527_s	5'-aagctcttcaatggaacggatcccctactggaatac-3'
Gmet_1527_as	5'-aagctcttcaccccttccatctgactgcacac-3'
orfX_Gmet_sol_s	5'-ggccggcatatggccaacgcggtctcgataccc-3'
orfX_Gmet_sol_as	5'-ggccggggatcctcacccttccatctgactgcacaccag-3'

Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung des *bss*-Operons

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
bssA	5'-aacaattcggcggaagat-3'
bssArev	5'-ccgcgatattctacagcttc-3'
bssA1	5'-tcgatatcccaacctacggg-3'
bssBseq2	5'-gctctcgccatgaagaagg-3'
bssCcod1	5'-gcaaggagattgcattacc-3'
bssD	5'-tgyccttggtgycataaycc-3'
bssDrev1	5'-ccttccccgtaaaccatgga-3'
bssD2	5'-tgygcngcngtntgyccnac-3'
bssDrev2	5'-ttttctatgaggtccttgag-3'
bssD3	5'-gtgaraattcctcttrttac-3'
bssDcod1	5'-gggtgcataatccagaaaccc-3'
bssDcod2	5'-aagagggtcttcatgttgcc-3'
bssDcod3	5'-gtcatgacgcctatgcttg-3'
bssDcod4	5'-aggcgttggtgaccaacct-3'
bssDcod5	5'-tttccttgccgtcatgacg-3'
bssDcod6	5'-aaaggattgagcgtcgg-3'
bssE2	5'-gtngtnggnaarcarggntg-3'
bssE2back	5'-datrtaytgnacrtaytcng-3'
bssE3	5'-cargtngcncnggngtng-3'
bssE3back	5'-gtncncngcngcdatcat-3'
bssE4	5'-gtgcggcaatacgygccgt-3'
bssEback	5'-cgatcatctcgccgkcatc-3'

Tab. 5: Verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung des *bbs*-Operons

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
bbsA	5'-ggstaycgtgyaaraatg-3'
bbsA1	5'-gayathacnttyttycaycc-3'
bbsA2	5'-gntgyaaraartgyggncar-3'
bbsAseq2	5'-ttaccacataggcactctc-3'
bbsAseq2rev	5'-gagagtcctatgtgggtaa-3'
bbsB1	5'-gcrccdatnggrtgncrta-3'
bbsB2	5'-gtraangcrtcrtgnarytc-3'
bbsB3forw	5'-taagagggtccgttgtagaca-3'
bbsB3rev	5'-tgtcacaacggaccctcta-3'
bbsB4forw	5'-cgcccaaggagacatttacc-3'
bbsB4rev	5'-ggtaaattgtctccttgggcg-3'
bbsB5forw	5'-atgaggaatccggaatcggc-3'
bbsC1forw	5'-aartaygtnacnggncarac-3'
bbsC1rev	5'-gtytgncngtnacrtaytt-3'
bbsC2forw	5'-gtygtygcngtnggngtrgc-3'
bbsC2rev	5'-gcyacnccnacngcracrac-3'

3. Medien und Puffer

Alle verwendeten Medien wurden mit entionisiertem Wasser hergestellt und mittels autoklavieren (45 Minuten bei 121°C und 2 bar Druck) oder filtrieren (0,2 µm Porengröße von Millipore, Eschborn) sterilisiert. Für die Kultivierung von fakultativ und obligat anaeroben Organismen wurden die entsprechenden Medien und Supplemente anaerobisiert. Dazu wurden die Lösungen vor dem autoklavieren erwärmt, mittels Unterdruck der Sauerstoff entzogen und anschließend die Atmosphäre durch Stickstoff ersetzt. Mit Hilfe dieser Technik wurden auch anoxische Puffer hergestellt, welche für anaerobe Assays eingesetzt wurden.

3.1 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Ein Medium für die Kultivierung von *E. coli* war Luria-Bertani-Medium (LB-Medium, Tab. 6). Als weiteres Medium wurde das sogenannte Autoinduktionsmedium (ZYP-5052 Komplexmedium für Autoinduktion, F. W. Studier, 2005) verwendet. Für die Expression von L-Selenomethionin substituierter Proteine in *E. coli* wurden die Zellen zunächst in M9-Minimalmedium angezogen und die entsprechenden Aminosäuren später zugegeben. Für die Anzucht von *E. coli* auf Platten wurde dem LB-Medium vor dem autoklavieren 1,5% Agar-Agar zugesetzt. Die als Selektionsmarker notwendigen Antibiotika wurden als 1000 fach konzentrierte Stammlösung angesetzt, sterilfiltriert und bei Bedarf dem Medium entsprechend zugesetzt (Tab. 19).

Tab. 6: Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

Komponente	Konzentration im Medium
NaCl	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	10 g/l

Tab. 7: Autoinduktionsmedium (ZY-5052 Komplexmedium für Autoinduktion)

Komponente	Anteil im Autoinduktionsmedium
ZY-Grundmedium	928 ml/l
1 M MgSO ₄	1 ml/l
50 fach 5052 Lösung	20 ml/l
20 fach NPS	50 ml/l
1000 fach Spurenelemente	0,4 ml/l

Die Komponenten wurden samt Antibiotikum unter sterilen Bedingungen zusammengegeben.

Tab. 8: ZY-Grundmedium

Komponente	Konzentration
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l

Das ZY-Grundmedium wurde vor gebrauch autoklaviert.

Tab. 9: NPS (20 fach)

Komponente	Konzentration
(NH ₄) ₂ SO ₄	66 g/l
KH ₂ PO ₄	136 g/l
Na ₂ HPO ₄	71 g/l

Die NPS-Lösung wurde vor gebrauch autoklaviert.

Tab. 10: 5052-Lösung (50 fach)

Komponente	Konzentration
Glycerin	250 g/l
D(+)-Glukose	25 g/l
α -Laktose	100 g/l

Zur besseren Löslichkeit wurde die Lösung in der Mikrowelle erhitzt und anschließend autoklaviert.

Tab. 11: Spurenelemente (1000 fach)

Komponente	Einwaage	Volumen in 100 ml Spurenelementlösung
0,1 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	27 g/l	50 ml
1 M CaCl_2	147 g/l	2 ml
1 M $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	198 g/l	1 ml
1 M $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	288 g/l	1 ml
0,2 M $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	48 g/l	1 ml
0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	17 g/l	2 ml
0,2 M $\text{NiCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	48 g/l	1 ml
0,1 M $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	24 g/l	2 ml
0,1 M $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	17 g/l	2 ml
0,1 M H_3BO_3	6 g/l	2 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$		36 ml

Das FeCl_3 wurde in 0,1 M HCl gelöst. Die Komponenten wurden einzeln angesetzt, die entsprechenden Volumina für insgesamt 100 ml Lösung zusammengegeben und diese dann sterilfiltriert.

Tab. 12: Magnesiumsulfat (1 M)

Komponente	Konzentration
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	24,65 g/l

Das Magnesiumsulfat wurde vor Gebrauch autoklaviert.

Tab. 13: Medium für die Expression L-Selenomethionin substituierten Proteinen

Komponente	Anteil im Medium
M9 Minimalmedium	989 ml/l
1000 fach Vitaminlösung	1 ml/l
100 fach Spurenelemente	10 ml/l

Die Komponenten wurden samt Antibiotikum unter sterilen Bedingungen zusammengegeben. 15 Minuten bevor die Überproduktion des Proteins induziert wurde, wurden die einzelnen Aminosäuren separat zum Medium gegeben (Tab. 16).

Tab. 14: M9 Minimalmedium für *E. coli*

Komponente	Anteil im M9 Minimalmedium
H ₂ O _{bidest}	778 ml/l
M9 Salzlösung	200 ml/l
1 M MgSO ₄	2 ml/l
D(+)-Glukose	20 ml/l
1 M CaCl ₂	0,1 ml/l

Das M9 Minimalmedium wurde vor Gebrauch autoklaviert.

Tab. 15: M9 Salzlösung

Komponente	Konzentration
Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	64 g/l
KH ₂ PO ₄	15 g/l
NaCl	2,5 g/l
NH ₄ Cl	5 g/l

Tab. 16: Aminosäuren für die Expression L-Selenomethionin substituierter Proteine

Aminosäure	Konzentration im Medium
L-Lysin	0,1 g/l
L-Threonin	0,1 g/l
L-Phenylalanin	0,1 g/l
L-Leucin	0,05 g/l
L-Isoleucin	0,05 g/l
L-Valin	0,05 g/l
L-Selenomethionin	0,05 g/l

Die Aminosäuren wurden zusammen in Lösung gebracht und anschließen sterilfiltriert.

Tab. 17: Spurenelemente (100 fach) für die Expression L-Selenomethionin substituierter Proteine

Komponente	Konzentration
Na ₂ -EDTA	5 g/l
FeCl ₃ * 6 H ₂ O	0,8 g/l
ZnCl ₂	50 mg/l
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg/l
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	10 mg/l
H ₃ BO ₃	10 mg/l
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	1,6 g/l
NiSO ₄ * 6 H ₂ O	10 mg/l
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	10 mg/l

Zunächst wurde das FeCl₃ zusammen mit dem EDTA in Lösung gebracht. Anschließend wurden die anderen Komponenten hinzugegeben und gelöst. Mittels NaOH wurde die Lösung auf pH 7,0 eingestellt und sterilfiltriert.

Tab. 18: Vitamine (1000 fach) für die Expression L-Selenomethionin substituierter Proteine

Komponente	Konzentration
Riboflavin (Vitamin B2)	1 g/l
Nikotinsäure (Vitamin B3)	1 g/l
Pyridoxin (Vitamin B6)	1 g/l
Thiaminchlorid (Vitamin B1)	1 g/l

Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert.

Tab. 19: Antibiotika und Supplemente

Komponente	Konzentration Stock-Lösung	Endkonzentration
Carbenicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml	34 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
IPTG	1 M	1 mM
AHT	0,2 g/l	200 µg/l
X-Gal	40 mg/ml	40 µg/ml

3.2 Medium zur Kultivierung von *D. toluolica* Stamm Tol2

Für die Anzucht von *D. toluolica* wurden anoxische Medien verwendet.

Tab. 20: Salzwassermedium für Sulfatreduzierer

Komponente	Anteil im Salzwassermedium
Grundmedium	949 ml/l
1000 fach Vitaminlösung	1 ml/l
1000 fach Spurenelementlösung	1 ml/l
1000 fach Selenit-Wolframat-Lösung	1 ml/l
0,2 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	10 ml/l
1 M NaHCO_3	30 ml/l
0,2 M $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	7,5 ml/l
0,3 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	0,6 ml/l

Die einzelnen Komponenten wurden unter sterilen Bedingungen zusammengegeben und anschließend der pH mit 1 M H_2SO_4 auf 7,0 bis 7,3 eingestellt. Als Kohlenstoff- und Energiequelle dienten 2 mM Toluol oder 2 mM Benzoat. Das Toluol wurde in sterilem Paraffinöl gelöst und davon 20 ml pro Liter Medium zugegeben. Das in destilliertem Wasser gelöste Benzoat wurde autoklaviert und entsprechend steril zum Medium zugegeben.

Tab. 21: Grundmedium für *D. toluolica*

Komponente	Konzentration
KH_2PO_4	0,2 g/l
NaCl	20,0 g/l
NH_4Cl	0,25 g/l
Na_2SO_4	4,0 g/l
$\text{MgCl} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	3,0 g/l
KCl	0,5 g/l

Tab. 22: Vitaminlösung für *D. tolulica* (1000 fach)

Komponente	Konzentration
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	5 g/l
4-Aminobenzoesäure	40 mg/l
Ca-D(+)-Pantothenat (Vitamin B5)	100 mg/l
Cyanocobalamin (Vitamin B12)	50 mg/l
D(+)-Biotin (Vitamin B7)	15 mg/l
Nikotinsäure (Vitamin B3)	100 mg/l
Pyridoxin (Vitamin B6)	150 mg/l
Folsäure (Vitamin B9)	40 mg/l
D,L-α-Liponsäure	15 mg/l
Thiaminchlorid (Vitamin B1)	100 mg/l
Riboflavin (Vitamin B2)	25 mg/l

Das Natriumphosphat wurde in H₂O_{bidest} gelöst, der pH auf 7,1 eingestellt und dann die Vitamine zugegeben. Die Lösung wurde sterilfiltriert, anaerobisiert und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

Tab. 23: Spurenelementlösung für *D. toluolica* (1000 fach)

Komponente	Konzentration
Na ₂ -EDTA	5,2 g/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	2,1 g/l
ZnCl ₂	144 mg/l
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	100 mg/l
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	2 mg/l
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	24 mg/l
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	36 mg/l
H ₃ BO ₃	30 mg/l
CoCl ₂ * 6H ₂ O	190 mg/l

Eisensulfat und EDTA wurden zunächst in H₂O_{bidest} gelöst und anschließend der pH auf 6,5 eingestellt. Die restlichen Spurenelemente wurden dann nacheinander gelöst, das ganze anaerobisiert und sterilfiltriert.

Tab. 24: Selenit-Wolframat-Lösung (1000 fach)

Komponente	Konzentration
NaOH	400 mg/l
Na ₂ SeO ₃	6 mg/l
Na ₂ WO ₄ * 2 H ₂ O	8 mg/l

Die Lösung wurde vor Gebrauch autoklaviert.

Tab. 25: Supplemente für das Salzwassermedium

Komponente	Konzentration der Stocklösung	Konzentration im Medium
0,2 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	30 g/l	2 mM
1 M NaHCO_3	84 g/l	30 mM
0,2 M $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	48 g/l	1,5 mM
0,3 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	50 g/l	0,2 mM

Die Lösungen wurden einzeln angesetzt, anaerobisiert und vor Gebrauch autoklaviert.

3.3 Medien zur Kultivierung von *G. metallireducens* Stamm GS-15

Es wurden anoxische Medien verwendet. Nitrat diente als terminaler Elektronenakzeptor.

Tab. 26: Nitratmedium für *G. metallireducens*

Komponente	Anteil im Salzwassermedium
Grundmedium	984 ml/l
1000 fach Vitaminlösung	1 ml/l
1000 fach Spurenelementlösung	1 ml/l
1000 fach Selenit-Wolframat-Lösung	1 ml/l
0,1 M Fe(III)-Citrat	10 ml/l
0,1 M CaCl ₂ * 2 H ₂ O	1 ml/l
0,8 M MgSO ₄	1 ml/l
0,2 M L(+)-Ascorbinsäure Natriumsalz	1 ml/l

Die einzelnen Komponenten wurden unter sterilen Bedingungen anaerob zusammengegeben. Anschließend wurde der pH mit anaerober 1 M HCl auf 6,8 eingestellt. Die verwendete Selenit-Wolframat-Lösung war die der Sulfatreduzierer. Ebenfalls wie bei den Sulfatreduzierern diente entweder 2 mM Toluol in Paraffinöl oder 2 mM Benzoat als Kohlenstoff- und Energiequelle.

Tab. 27: Grundmedium für *G. metallireducens*

Komponente	Konzentration
NaHCO ₃	3,4 g/l
NaNO ₃	0,4 g/l
KCl	0,1 g/l
NH ₄ Cl	0,1 g/l
KH ₂ PO ₄	0,9 g/l

Tab 28: Vitaminlösung für *G. metallireducens* (1000 fach)

Komponente	Konzentration
4-Aminobenzoessäure	80 mg/l
Ca-D(+)-Pantothenat (Vitamin B5)	100 mg/l
Cyanocobalamin (Vitamin B12)	100 mg/l
D(+)-Biotin (Vitamin B7)	20 mg/l
Nikotinsäure (Vitamin B3)	200 mg/l
Pyridoxin (Vitamin B6)	300 mg/l
Thiaminchlorid (Vitamin B1)	200 mg/l

Tab. 29: Spurenelementlösung für *G. metallireducens* (1000 fach)

Komponente	Konzentration
$\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	100 mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	190 mg/l
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	36 mg/l
ZnCl_2	70 mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2 mg/l
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	24 mg/l
H_3BO_3	6 mg/l
HCl (25%ig)	10 ml/l

Zunächst wurde das Eisenchlorid in HCl gelöst und mit 800 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgefüllt. Anschließend wurden die einzelnen Komponenten hinzugegeben und gelöst. Die Lösung wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf einen Liter aufgefüllt, anaerobisiert und autoklaviert.

4 Kultivierung von Bakterien und Herstellung von Zellextrakten

4.1 Kultivierung von *E. coli*

Für die Kultivierung aller verwendeten *E. coli*-Stämme (Material und Methoden Tab. 1) wurden die entsprechenden Antibiotika (Material und Methoden Tab. 19) zum LB-Medium (Material und Methoden Tab. 6) zugegeben und die Kulturen unter aeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff zu gewährleisten, wurden Kulturen im 200 ml Maßstab im Schikanekolben bei 200 Umdrehungen pro Minute (rpm) inkubiert und Kulturen im 2 l Maßstab im 5 l Erlenmeyerkolben auf einem Magnet-Rührer bei 800 rpm inkubiert. Nach Induktion der Transkription rekombinanter Gene (Material und Methoden Tab. 19) wurden die Kulturen bei Raumtemperatur inkubiert, um ein höheres Maß an löslichem Protein zu erreichen. Für die heterologe Expression von Proteinen mittels Autoinduktion (Material und Methoden Tab. 7) wurde wie folgt verfahren. Die Kulturen wurden zunächst bei Raumtemperatur inkubiert und ab einer optischen Dichte (OD) von 0,4 bis 0,6 bei einer Temperatur von 16°C inkubiert, ebenfalls um die Löslichkeit der rekombinanten Proteine zu erhöhen. Allgemein wurde das Wachstum durch Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm photometrisch bestimmt. Nachdem die Kulturen eine ausreichende OD erreicht hatten, wurden sie mittels Zentrifuge geerntet, in Puffer resuspendiert um Reste von Medium zu entfernen und dann erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend bei -80°C gelagert oder direkt zu Zellextrakt verarbeitet.

4.2 Kultivierung von *Desulfobacula toluolica*

Zunächst erfolgte die Kultivierung in 100 ml Müller-Krempel-Flaschen um ausreichend Zellmasse zu erhalten. Daraus gingen dann Kulturen im 2 Liter Maßstab hervor, als Medium diente das Salzwassermedium für Sulfatreduzierer (Material und Methoden Tab. 20) mit 2 mM Toluol oder 2 mM Benzoat als Kohlenstoff- und Energiequelle. Da Toluol bereits ab einer Konzentration von 1 mM toxisch für die Zellen wirken kann, wurde das Medium mit 2 % (v/v) Paraffinöl (Roth, Karlsruhe) überschichtet. Das darin gelöste Toluol diente als Reservoir für das Medium. Als Elektronenakzeptor diente jeweils Sulfat, das in einer Konzentration von 28 mM vorlag (Widdel und Bak 1992). Die Kulturen wurden bei einer Temperatur von 30°C stehend inkubiert. Als Gasphase diente ein Gasgemisch aus 20% Kohlenstoffdioxid und 80% Stickstoff, welches man in regelmäßigen Abständen, in Abhängigkeit vom Wachstum der Kulturen, erneuerte. Dabei wurde gleichzeitig der entstandene

Schwefelwasserstoff unter einem Abzug entfernt. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Konzentration von Sulfid im Medium photometrisch verfolgt. Eine Bestimmung der optischen Dichte war bei diesen Organismen aufgrund der äußerst geringen Zellmasse nicht möglich. Das Wachstum konnte außerdem kontinuierlich per Auge überprüft und die Zellen dann bei Bedarf geerntet werden.

4.3 Kultivierung von *Geobacter metallireducens*

Die Kultivierung von *G. metallireducens* erfolgte ähnlich wie die von *D. toluolica*. Zunächst wurden Kulturen im kleinen Maßstab von 100 ml angezogen mit denen man dann schließlich Kulturen im 2 Liter Maßstab mit 5% Inokulum animpfte. Als Medium diente das Nitratmedium (Material und Methoden Tab. 26). Kohlenstoff- und Energiequelle waren entweder Toluol oder Benzoat, jeweils in einer Konzentration von 2 mM. Wie bei den Sulfatreduzierern wurde auch hier Toluol zusammen mit 2% Paraffinöl im Medium verwendet, um eine toxische Wirkung des Toluols zu verhindern. Als Elektronenakzeptor diente Nitrat, zunächst in einer Konzentration von 15 mM. Eine Verringerung der Konzentration auf 5 mM brachte jedoch eine deutliche Verbesserung des Wachstums (Ergebnisse 1.3.1). Die Inkubation erfolgte schüttelnd (100 rpm) bei 30°C. Um die Konzentration an Nitrat und Nitrit im Medium zu Überprüfen wurden Teststäbchen verwendet (Quantofix® Nitrat, Macherey-Nagel, Düren). Das Wachstum bestimmte man mit Hilfe der optischen Dichte, die photometrisch bei 578 nm gemessen wurde. Die Zellernte erfolgte unter anaeroben Bedingungen (Material und Methoden 4.4).

Um eine große Menge an Zellen zu erhalten, wurde *G. metallireducens* im 100 Liter Maßstab in einem Fermenter (Typ 883 525/0, B. Braun, Melsung) angezogen. Dabei zog man die Zellen zunächst auf Toluol an, später diente Benzoat als Kohlenstoff- und Energiequelle. Die Bedingungen waren die gleichen wie bei der Anzucht im kleineren Maßstab. Die Zellen wurden aus technischen Gründen unter aeroben Bedingungen mit einer Durchlaufzentrifuge (CEPA, Typ Z41, Carl Padberg, Lahr) bei 20000 rpm geerntet, anschließend direkt in flüssigem Stickstoff gefroren und anaerob bei -80°C aufbewahrt.

4.4 Anaerobe Zellernte und Zellaufschluss

Für die anaerobe Zellernte wurden die entsprechenden Zentrifugenbecher zwei Tage zuvor ins Anaeroben-Zelt eingeschleust um sicherzustellen, dass kein Sauerstoff mehr im Material vorhanden war. Man füllte die Kulturen im Anaeroben-Zelt in die Zentrifugenbecher, zentrifugierte diese (Sorvall

RC6 plus, Thermo Scientific, Dreieich) für 15 Minuten bei 6095 g und 4°C und bewahrte Aliquots der Feuchtzellen unter anaeroben Bedingungen bei -80°C auf. Bei Bedarf wurden die Zellen dann im Anaeroben-Zelt in anoxischem Puffer (100 mM Tris, pH 6,8) resuspendiert und mit Hilfe einer French-Press (French Pressure Cell Press, American Instrument Company, Silver Spring, Maryland) aufgeschlossen (3 Durchgänge, 1000 psi). Das Lysat zentrifugierte man mit einer Ultrazentrifuge (Optima L-90K, Beckman Coulter, Krefeld) für 60 Minuten bei 125975 g und 4°C. Der Zellextrakt wurde anschließend aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt oder direkt weiterverwendet.

5. Molekularbiologische Methoden

5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

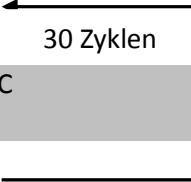
Die Polymerase Kettenreaktion (Mullis und Faloona, 1987) diente zur gezielten Vervielfältigung von DNA-Bereichen. Dafür wurden Primer verwendet, welche direkt aus dem Genom der verwendeten Organismen abgeleitet wurden und den 5'- und 3'-Bereich des zu amplifizierenden Gens flankierten. Als Matrize für die Amplifikation dienten Zellen der entsprechenden Organismen, welche mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf eine optische Dichte von 0,1 verdünnt wurden. Diese setzte man dann in Volumina von 1 μl bis 10 μl im Reaktionsansatz ein und amplifizierte so die gewünschte genetische Information. Als DNA-Polymerase diente die Phusion® High-Fidelity-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt).

Tab. 30: Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen pro Ansatz
Puffer (5 fach)	10 μl
Sense-Primer (5 μM)	5 μl
Antisense-Primer (5 μM)	5 μl
dNTP-Mix (10 mM)	1 μl
Zellsuspension (OD 0,1)	1 μl – 5 μl
DNA-Polymerase (2 U/ μl)	0,5 μl
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	Ad 50 μl

Tab. 31: Programm eines typischen PCR-Ansatzes

Schritt	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	30 Sekunden	98°C
Denaturierung	10 Sekunden	98°C
Annealing	20 Sekunden	45°C – 65°C
Elongation	30 Sekunden	72°C
Terminale Elongation	10 Minuten	72°C



A bracket on the right side of the table groups the Denaturierung, Annealing, and Elongation steps, with an arrow pointing to the text "30 Zyklen".

5.2 Reinigung von PCR-Produkten

Für die Reinigung von PCR-Produkten wurde das GeneJet™ PCR Purification Kit (Fermentas, St. Leon Roth) verwendet. Als Protokoll diente das beiliegende Standardprotokoll des Herstellers, wobei die DNA nach dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie über Silikatmembran-Säulen gereinigt wurde.

5.3 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Für die Auftrennung von DNA-Molekülen wurden Minigele aus 1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) verwendet, als Laufpuffer diente ebenfalls TAE-Puffer. Die DNA wurde in Probenpuffer (50% (w/v) Glycerin, 100 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, 0,1% Bromphenolblau) aufgenommen und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard diente der GeneRuler™ Middle-range DNA Marker (Fermentas, St. Leon Roth). Bei einer Spannung von 120 V für 20 Minuten trennte Gel auf und inkubierte das Gel dann für 5 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (5 µM). Mit Hilfe von UV-Licht der Wellenlänge von 302 nm wurden die entsprechenden Banden dann sichtbar gemacht und photographiert.

5.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Nachdem man das entsprechende Plasmid in *E. coli* transformiert hatte (Material und Methoden 6.4), wurden die Zellen über Nacht bei 37°C in LB-Medium und dem geeigneten Antibiotikum inkubiert. Zur Reinigung der Plasmid-DNA diente das GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, St. Leon Roth) welches nach Standardprotokoll verwendet wurde. Zur Analyse der Plasmid-DNA wurde diese mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten (Material und Methoden 5.5) und dieses dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Material und Methoden 5.3).

5.5 Restriktionsanalyse von Plasmid DNA

Um zu überprüfen ob die Klonierung eines Gens in einen Vektor erfolgreich war, wurde als erster Schritt die Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Anhand des Bandenmusters nach Auftrennung durch Gelelektrophorese konnte dann entschieden werden, ob die Klonierung erfolgreich war (Material und Methoden, Tab. 32). Eine genauere Analyse erfolgte dann durch Sequenzierung.

Tab. 32: Restriktionsanalyse von Plasmid DNA

Vektor	Restriktionsendonuklease	erwartete Fragmente
pET-16b	<i>Bam</i> HI, <i>Nde</i> I	Insert und linearer Vektor
pEntry-IBA20	<i>Esp</i> 3I	Insert und linearer Vektor
pASG-IBA5	<i>Xba</i> I, <i>Hind</i> III	Insert und linearer Vektor
pTrc99A	<i>Bam</i> HI, <i>Nco</i> I	Insert und linearer Vektor

6. Klonierung

6.1 Kombinatorisches Klonen mit dem StarGate®-System (IBA)

Ein Teil der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurde mit dem StarGate®-System (IBA, Göttingen) hergestellt. Ausgangspunkt war ein PCR-Produkt mit *Lg**ul*-Restriktionsendonuklease-Schnittstellen am 3'- und 5'-Ende. Durch Restriktion des PCR-Produkts und des sogenannten „Entry-Vektors“ (pE-IBA20) mit *Lg**ul*-Restriktionsendonuklease und anschließender Ligation wurde der „Donorvektor“ konstruiert (Material und Methoden Tab. 33). In einem weiteren Schritt war es dann möglich, die genetische Information im „Donorvektor“ in einen beliebigen „Akzeptorvektor“ des StarGate-Systems zu klonieren. Dazu wurden der „Donorvektor“ sowie ein beliebiger „Akzeptorvektor“ mit einer *Esp*3I-Restriktionsendonuklease geschnitten und ligiert (Material und Methoden Tab. 34). Sowohl bei der Klonierung in den „Donorvektor“ als auch in den „Akzeptorvektor“ konnte nach Transformation des selbigen in *E. coli* und entsprechender Kultivierung auf LB-Agarplatten mit X-Gal (Material und Methoden Tab. 19) bereits durch den Blau/Weiß-Test entschieden werden, ob es sich um einen positiven Klon handelt. Bei erfolgreicher Klonierung in „Donor- oder Akzeptorvektor“ konnte es nach Transformation in entsprechende Zellen (*E. coli* DH5 α) nicht zur Alpha-Komplementation kommen. Folglich handelte es sich bei weißen Kolonien um positive Klone.

Tab. 33: Klonierung in Donorvektoren

Komponente	Volumen pro Ansatz
25 ng/μl Entry-Vektor (pE IBA 20)	1 μl
100ng/μl PCR-Produkt	1 μl
10 fach Tango Puffer	5 μl
100 mM DTT	5 μl
10 mM ATP	2,5 μl
<i>LguI</i> (5 U/μl)	0,5 μl
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	1 μl
H ₂ O _{bidest}	ad. 50 μl

Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 30°C inkubiert und anschließend 5 μl davon für die Transformation in *E. coli* DH5α eingesetzt. Als Antibiotikum diente Kanamycin in einer Konzentration von 50 μg/ml, X-Gal wurde mit 40 μg/ml verwendet.

Tab. 34: Klonierung in Akzeptorvektoren

Komponente	Volumen pro Ansatz
25 ng/μl Expressionsvektor	1 μl
100ng/μl Donorvektor	1 μl
10 fach Tango Puffer	5 μl
100 mM DTT	5 μl
10 mM ATP	2,5 μl
<i>Esp3I</i> (10 U/μl)	0,5 μl
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	1 μl
H ₂ O _{bidest}	ad. 50 μl

Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend 5 μl davon für die Transformation in *E. coli* DH5α eingesetzt. Als Antibiotikum diente Carbenicillin in einer Konzentration von 50 μg/ml, X-Gal wurde mit 40 μg/ml verwendet.

6.2 Klonierung der pET-16b-Vektoren

Eine weitere Klonierungsstrategie in dieser Arbeit war das Klonieren von Genen in pET-16b-Vektoren. Dabei erfolgte die Klonierung des Gens direkt in den Expressions-Vektor und ohne Zwischenschritt. Die Primer für Amplifikation des entsprechenden Gens wurden mit Restriktionsendonuklease Schnittstellen versehen. Der Sense-Primer mit einer *NdeI*-Restriktionsendonuklease Schnittstelle und der Antisense-Primer mit einer *BamHI*-Restriktionsendonuklease Schnittstelle. Man inkubierte zunächst das PCR-Produkt sowie den pET-16b-Vektor mit beiden Restriktionsendonukleasen, dephosphorylierte den linearisierten Vektor und reinigte anschließend beide Ansätze (Material und Methoden 5.2). Danach bestimmte man die Konzentration an DNA und ligierte PCR-Produkt und Vektor in unterschiedlichen Massen-Verhältnissen von Vektor zu Insert. Dabei wurde die Anzahl der Nukleotide von Vektor und Insert einbezogen (Gleichung 1). Anschließend transformierte man den Vektor mit Insert in *E. coli* DH5α Zellen (Material und Methoden 6.4).

$$m_{\text{Insert}} = \frac{m_{\text{Vektor}} * nt_{\text{Insert}}}{nt_{\text{Vektor}}}$$

Gleichung 1: Berechnung des Verhältnisses von Masse des Inserts zur Masse des Vektors. Um die Masse von Vektor und Insert in Bezug zu setzen wurde das Verhältnis der Anzahl der Nukleotide berücksichtigt. m_{Insert} : Masse des Insert, m_{Vektor} : Masse des Vektors, nt_{Insert} : Anzahl der Nukleotide des Inserts, nt_{Vektor} : Anzahl der Nukleotide des Vektors.

Tab. 35: Typischer Ansatz einer Klonierung eines Inserts in einen pET-16b-Vektor. Als Beispiel dient ein Vektor mit 6000 nt und ein Insert mit 2000 nt.

Komponente	Insert : Vektor 2 : 1	Insert : Vektor 3 : 1	Insert : Vektor 4 : 1	Insert : Vektor 5 : 1
T4 DNA Ligase (1 U/μl)	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl
T4 Puffer (10 fach)	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
pET-16b	30 ng	30 ng	30 ng	30 ng
Insert	20 ng	30 ng	40 ng	50 ng
H ₂ O _{bidest}	ad. 20 μl	ad. 20 μl	ad. 20 μl	ad. 20 μl

6.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Von einer Einzelkolonie des betreffenden *E. coli* Stammes ausgehend wurde eine 5 ml Kultur über Nacht angezogen, damit 400 ml SOB-Medium (2,0 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄) inokuliert und bis zu einer OD_{578nm} von 0,4 bis 0,6 bei 18°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis inkubiert und dann bei 4°C und 4500 g (Centrifuge 5804 R; Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Man verwarf den Überstand und resuspendierte die Zellen in 25 ml kaltem Transformationspuffer (10 mM PIPES; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl (pH 6,7); 55 mM MnCl₂). Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10 Minuten und eine erneute Zentrifugation bei 4500 g und 4°C für 10 Minuten. Nach Aufnahme der Zellen in 5 ml Transformationspuffer wurden 7 % (v/v) steriles DMSO hinzugefügt, Aliquots zu je 50 μl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

6.4 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

50 µl chemisch kompetenter Zellen (Material und Methoden 6.2) wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 µl reiner Plasmid-DNA (100 ng) oder 5 µl eines Ligationsansatzes versetzt. Der Ansatz wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert worauf ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden folgte. Danach wurden die Zellen nochmals für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

6.5 Sequenzierung von DNA

DNA Proben wurden von der Firma Seqlab (Göttingen) mittels extended HotShot Sequenzierungsreaktion analysiert. Die Proben wurden nach Firmenvorschrift vorbereitet.

7. Biochemische Methoden

7.1 Heterologe *in vivo* Expression Plasmid-kodierter Gene in *E. coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmidkonstrukte wurden in unterschiedliche *E. coli*-Stämme transformiert und entsprechend überproduziert. Nahezu alle verwendeten Gene wurden durch rare Codons kodiert, weswegen in diesen Fällen der *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3)pLysS verwendet wurde. Dieser enthält zusätzlich ein Plasmid (pRARE) auf dem zusätzliche tRNA-Gene für, in *E. coli* rare Codons vorhanden sind (argU, argW, glyT, ileX, leuW und proL). Für die Induktion wurden ebenfalls verschiedene Substanzen und Methoden angewendet.

Tab. 36: Überproduktion diverser Proteine in unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen

Protein	Organismus	Plasmid	<i>E.coli</i> -Stamm	Induktion
BbsG	<i>G. metallireducens</i>	pET-16b	Rosetta (DE3)pLysS	Autoinduktion
BbsG	<i>D. toluolica</i>	pASG IBA3	Rosetta (DE3)pLysS	AHT (200 µg/l)
BbsG	<i>T. aromatica</i>	pTrc99A	DH5α	IPTG (1 mM)
EtfBA	<i>G. metallireducens</i>	pET-16b	Rosetta (DE3)pLysS	Autoinduktion
EtfBA	<i>D. toluolica</i>	pASG IBA3	Rosetta (DE3)pLysS	AHT (200 µg/l)
EtfBA	<i>A. aromatica</i>	pET-16b	Rosetta (DE3)pLysS	IPTG (1 mM)
OrfX	<i>G. metallireducens</i>	pET-16b	Rosetta (DE3)pLysS	IPTG (1 mM)
OrfX2	<i>G. metallireducens</i>	pET-16b	Rosetta (DE3)pLysS	IPTG (1 mM)

7.1.1 Überproduktion rekombinanter Proteine durch Autoinduktion

Nachdem frisch transformierte Zellen über Nacht auf LB-Agarplatten gewachsen waren, wurde eine Kolonie gepickt und damit 5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft. Diese wurde über Tag bei 37°C inkubiert und daraus am Abend eine Vorkultur mit 100 ml LB-Medium und entsprechenden Antibiotika angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C inkubierte man am

nächsten Morgen die Hauptkultur (2 L) auf eine OD₅₇₈ von 0,1 an. Die Hauptkultur wurde jedes Mal frisch mit den einzelnen Komponenten komplementiert (Material und Methoden Tab. 7). Man inkubierte dann die Hauptkultur bei Raumtemperatur unter rühren so lange, bis die OD₅₇₈ bei 0,4 lag und ließ sie dann bei 16°C bis zu einer OD₅₇₈ von 10 wachsen. Dabei musste eine ausreichende Belüftung durch intensives rühren (800 rpm) sichergestellt werden. Bei der niedrigen Temperatur dauerte es 35 bis 40 Stunden, bis die Kultur die entsprechende OD₅₇₈ erreichte. Im Anschluss erntete man die Zellen unter aeroben Bedingungen, resuspendierte sie nochmals in Puffer (20 mM KPP, pH 7,4, 500 mM NaCl) um diese zu waschen und zentrifugierte danach erneut. Die Zellen wurden dann bei -80°C gelagert oder direkt nach dem waschen weiter verarbeitet.

7.1.2 Überproduktion rekombinanter Proteine durch klassische Induktion

Wie bei der Überproduktion rekombinanter Proteine durch Autoinduktion wurden frisch transformierte Zellen über Nacht auf LB-Agar mit entsprechenden Antibiotika bei 37°C angezogen. Man pickte eine Kolonie, impfte damit 100 ml LB-Medium mit Antibiotika an und inkubierte diese Vorkultur dann über Nacht bei 37°C. Mit dieser Vorkultur wurde dann am nächsten Morgen 2 L LB-Medium samt Antibiotika auf eine OD₅₇₈ von 0,1 inokuliert und diese Hauptkultur dann bei 37°C inkubiert. Nachdem die Hauptkultur eine OD₅₇₈ von 0,5 bis 0,6 erreicht hatte, induzierte man die Expression rekombinanter Proteine. Dazu versetzte man die Kultur mit dem entsprechenden Induktor (Material und Methoden Tab. 35) und inkubierte sie anschließend rührend (800 rpm) für 4 Stunden bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden dann unter aeroben Bedingungen geerntet, mit Puffer (20 mM KPP, pH 7,4, 500 mM NaCl) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Lagerung fand bei -80°C statt oder die Zellen wurden direkt weiterverarbeitet.

7.1.3 Überproduktion von L-Selenomethionin substituiertem Elektronen-Transferierendem Flavoprotein

Elektronen-Transferierendes Flavoprotein aus *G. metallireducens* wurde für kristallographische Zwecke mit L-Selenomethionin statt L-Methionin überproduziert. Dabei wurden frisch transformierte Zellen über Nacht auf LB-Agar mit entsprechenden Antibiotika bei 37°C angezogen. Mit einer Kolonie impfte man dann am nächsten Morgen 5 ml flüssiges LB-Medium mit Antibiotikum an und inkubierte über Tag bei 37°C. Diese 5 ml Kultur verwendete man dann, um am Abend die Vorkultur aus 300 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum anzuimpfen (1:1000) und inkubierte diese über Nacht

bei 37°C. Am nächsten Morgen inkubierte man dann fünf Mal jeweils 1 Liter Medium (Material und Methoden, Tab. 14) mit jeweils 10 ml Vorkultur und inkubierte die Hauptkultur bei Raumtemperatur. Ab einer OD₅₇₈ von 0,6 wurden die entsprechenden Aminosäuren (Material und Methoden, Tab. 16) zugegeben und 15 Minuten später die Expression durch Zugabe von jeweils 1 mM IPTG induziert. Nach vier Stunden wurden die Zellen zentrifugiert, gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

7.2 Reinigung rekombinanter Proteine

7.2.1 Reinigung von Proteinen mit poly-Histidin-Tag

Die Reinigung von Proteinen mit poly-Histidin-Tag fand unter aeroben Bedingungen bei 4°C statt. Der Zellextrakt von *E. coli* mit dem heterolog überexprimierten Protein wurde mit einer P1 Peristaltik-Pumpe (GE Healthcare, München) auf eine Tricorn-Säule mit IMAC Sepharose Fast Flow (2 ml, GE Healthcare, München) geladen. Die Vorbereitung der Säule sah wie folgt aus. Zunächst wurde die Säule mit 10 ml H₂O_{bidest} gewaschen und dann mit 2 ml 0,2 M NiSO₄ geladen. Überschüssiges NiSO₄ entfernte man durch erneutes waschen mit 10 ml H₂O_{bidest}. Abschließend wurde die Säule mit 20 ml Grundpuffer (20 mM KPP, pH 7,4, 0,5 M NaCl) equilibriert und konnte dann verwendet werden. Der Zellextrakt wurde ebenfalls mit Grundpuffer hergestellt, um optimale Interaktion des poly-Histidin-Tag mit dem Säulenmaterial zu gewährleisten. Nachdem der Zellextrakt auf die Säule geladen war, wurde zunächst mit 20 ml Grundpuffer gewaschen. Die unspezifisch gebundenen Proteine entfernte man dann, indem man die Konzentration an Imidazol im Grundpuffer Stufenweise erhöhte. Im ersten Schritt wurden 20 ml Grundpuffer mit 20 mM Imidazol verwendet und im zweiten Schritt 20 ml Grundpuffer mit 80 mM Imidazol. Die Elution des überexprimierten Proteins wurde mit 40 ml Grundpuffer mit 200 mM Imidazol vollzogen.

7.2.2 Reinigung von Proteinen mit Strep-Tag®

Die Reinigung von Proteinen mit Strep-Tag® fand ebenfalls unter aeroben Bedingungen bei 4°C statt. Der Zellextrakt wurde mit Strep-Tag® Grundpuffer (100 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl) hergestellt und mit einer P1 Peristaltik Pumpe (GE Healthcare, München) auf eine Tricorn-Säule mit Strep-Tactin® Superflow® (10 ml, IBA, Göttingen) geladen. Vor Benutzung regenerierte man die Säule mit

30 ml Grundpuffer mit 1 mM HABA (2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure) und equilibrierte danach mit 30 ml Grundpuffer um nicht gebundenes HABA zu entfernen. Nachdem dem Laden des Zellextrakts auf die Säule, wurde zunächst mit 50 ml Grundpuffer gespült und dann das rekombinante Protein mit 40 ml Grundpuffer mit 2,5 mM Desthiobiotin eluiert.

7.2.3 Reinigung der Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *T. aromatica*

Da die rekombinante Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *T. aromatica* über keinen Tag verfügt, wurde das Protein in drei Chromatographieschritten gereinigt.

Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sepharose Fast Flow. Verwendet wurde eine XK 16/70 Säule (25 ml, GE Healthcare, München) mit DEAE Sepharose Fast Flow. Für die Herstellung des Zellextrakts mit dem heterolog exprimierten Protein wurde Grundpuffer (10 mM Triethanolamin, pH 7,5, 10% Glycerin) verwendet und dieser dann mit einer P1 Peristaltik Pumpe (GE Healthcare, München) auf die Säule geladen. Im weiteren Verlauf verwendete man eine ÄKTApurifier™ (GE Healthcare, München), die lineare Flussrate betrug 3 ml/min. Die Säule wurde, nachdem der Zellextrakt geladen war, mit 50 ml Grundpuffer gespült. Um die Proteine schrittweise von der Säule zu eluieren wurde ein linearer Gradient mit steigender NaCl-Konzentration im Grundpuffer gefahren. Die Konzentration an NaCl wurde von 0 mM auf 500 mM über ein Volumen von 200 ml erhöht und das Eluat in Fraktionen von je 5 ml aufgefangen. Die Fraktionen mit der höchsten Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität wurden zusammengegeben und für den zweiten Chromatographieschritt verwendet.

Hydroxylapatit-Chromatographie. Verwendet wurde eine XK 16/40 Säule (15 ml, GE Healthcare, München) mit CHT Hydroxylapatit Typ I (Bio-Rad, München), als Grundpuffer diente der gleiche Puffer wie im ersten Chromatographieschritt. Das aktive Eluat der Anionenaustauschchromatographie wurde mit einer P1 Peristaltik Pumpe auf die Säule geladen und anschließend wieder eine ÄKTApurifier™ (GE Healthcare, München) mit einer linearen Flussrate von 3 ml/min verwendet. Nach dem Laden der Probe auf die Säule wurde diese mit 75 ml Grundpuffer gespült. Man eluierte die Proteine schrittweise von der Säule, indem man die Konzentration an Kaliumphosphat im Grundpuffer von 0 mM auf 50 mM über ein Volumen von 180 ml erhöhte und fraktionierte das Eluat in 5 ml Aliquots. Fraktionen mit der höchsten Konzentration an Benzylsuccinyl-

CoA-Dehydrogenase-Aktivität wurden zusammengegeben, konzentriert und für den dritten Chromatographieschritt verwendet.

Größenausschlusschromatographie. Verwendet wurde eine HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (120 ml, GE Healthcare, München), als Puffer diente 50 mM KPP mit pH 7,4 und 150 mM NaCl. Die ankonzentrierte Probe der Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase wurde mit einem 1 ml Loop auf die Säule geladen und mit einer linearen Flussrate von 1 ml/min aufgetrennt. Man fraktionierte das Eluat in Aliquots von 2 ml und vereinte die Fraktionen mit der höchsten Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität.

7.3 Konzentrierung von Proteinen

Für die Konzentrierung von Proteinen wurden zwei Methoden verwendet. Bei Volumina zwischen 20 ml und 50 ml wurde eine 50 ml Rührzelle (Amicon, Modell 8050, Millipore, Eschborn) zusammen mit einer Ultrafiltration Membran mit entsprechenden cut-off (Millipore, Eschborn) verwendet. Bei geringeren Volumina verwendete man eine Vivaspin 20 Zentrifugaleinheit (Sartorius Stedim, Melsungen) in einer Zentrifuge (Centrifuge 5403, Ausschwingrotor A-4-44, Eppendorf, Hamburg) bei 4500 g. Die Konzentration erfolgte jeweils bei 4°C.

7.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer apparenten Molekülmasse verwendete man die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Die Proben wurden zunächst mit SDS-Probenpuffer (Material und Methoden, Tab. 37) versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Als Proteinstandard diente PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot), der jeweils direkt auf das Gel aufgetragen wurde. Man nutzte die diskontinuierliche SDS-Page, welche aus einem Trenn- und einem Sammelgel besteht (Material und Methoden, Tab. 36). Die SDS-PAGE fand bei Raumtemperatur in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1% SDS) statt. Die Proben bereitete man so vor, dass jeweils eine Menge von 25 µg Protein auf das Gel aufgetragen wurde (bei gereinigtem Protein etwa 5 µg - 8 µg). Die elektrische Spannung lag bei 80 Volt und konnte nach Durchlaufen der Proben durch das Sammelgel auf 200 Volt erhöht werden. Man beendete die Elektrophorese bevor die Lauffront das Ende des

Trenngels erreichte. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden die Gele in einer Färbelösung aus 0,25% (w/v) Coomassie Blue R 250, 5% (v/v) Essigsäure und 50% (v/v) Ethanol gefärbt. Um eine schnellere Färbung und Entfärbung zu erreichen, wurde das Gel in der Färbelösung aufgekocht, 10 Minuten schwenkend inkubiert und zur Entfärbung in Entfärber-Lösung (10 % (v/v) Ethanol, 7 % (v/v) Eisessig) aufgekocht und bis zum Verlust der überflüssigen Färbung darin inkubiert.

Tab. 37: SDS-PAGE Probenpuffer (5 fach)

Komponente	Konzentration
Natriumdodecylsulfat	10% (w/v)
β-Mercaptoethanol	10 mM
Glycerin	20% (v/v)
Tris pH 6,8	200 mM
Bromphenolblau	0,05%

Tab. 38: Polyacrylamidgele (2 Gele, 15%)

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Tris/HCl pH 8,8 (1 M)	4,5 ml	-
Tris/HCl pH 6,8 (1 M)	-	0,705 ml
H ₂ O _{bidest}	0,63 ml	3,81 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid (29/1)	5,558 ml	1,425 ml
10% SDS	0,126 ml	0,06 ml
5% TEMED	0,126 ml	0,06 ml
10% APS	0,18 ml	0,12 ml

7.5 Isolieren des Kofaktors des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens*

7.5.1 Denaturieren des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins

Zur Analyse des Kofaktors wurden 99,1 nmol des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins für 10 Minuten bei 95°C gekocht. Anschließend zentrifugierte man den Ansatz für 15 Minuten bei 16200 g (Heraeus Fresco 17, Thermo Scientific, Dreieich) und überführte anschließend den Überstand in ein anderes Gefäß.

7.5.2 Herstellen des Apoenzyms des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins

Zur Herstellung des Apoenzyms wurden 103,2 nmol des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins zusammen mit 2 M Kaliumbromid in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 inkubiert und zusammen in einer Vivaspinn 20 Zentrifugaleinheit mit einem cut-off von 10000 Da zentrifugiert. Dabei zentrifugierte man in Intervallen von 5 Minuten jeweils bei 4500 g und 4°C (Centrifuge 5403, Ausschwingrotor A-4-44, Eppendorf, Hamburg) und gab bei Bedarf frischen Puffer mit Kaliumbromid dazu. Die Zentrifugation wurde so lange fortgesetzt bis keine gelbe Färbung des Proteins vorhanden war und zur Kontrolle ein UV-Vis Spektrum des Apoproteins und des Durchlaufs angefertigt. Man bestimmte die spezifische Aktivität des Apoproteins und bewahrte es anschließend auf Eis bei 4°C auf.

7.6 Rekonstitution des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens*

Das Apoprotein des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins wurde in zwei Aliquots von jeweils 48,7 nmol Protein aufgeteilt und bei 4°C auf Eis gelagert. Anschließend inkubierte man die beiden Proben mit 1 mM FAD beziehungsweise 1 mM FMN in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 auf Eis bei 4°C für 12 Stunden. Im Anschluss daran entfernte man nicht gebundenes FAD oder FMN mit Hilfe einer Entsalzungssäule (PD-10 Entsalzungssäule, GE Healthcare, München) und 100 mM Tris/HCl pH 8,0.

8. Chemische Methoden und Synthesen

8.1 Synthese von (*E*)-Phenylitaconat

Die Synthese von (*E*)-Phenylitaconat erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Ravina et al. (2002), das Prinzip des Synthesewegs ist in Abb. 3 dargestellt. Man löste 35 mmol (3,8 g) Benzaldehyd zusammen mit 44 mmol (6,4 g) Dimethylsuccinat in 5 ml *tert*-Butanol und gab das Gemisch tropfenweise über einen Zeitraum von vier Stunden zu einer Lösung aus 39 mmol (4,3 g) Kalium-*tert*-Butanol in 25 ml *tert*-Butanol. Der ganze Ansatz wurde während der Zugabe und weitere drei Stunden danach unter Reflux gekocht. Anschließend entfernte man das Lösemittel *tert*-Butanol mit Hilfe eines Rotationsverdampfers vollständig und löste den erhaltenen Niederschlag in 25 ml 1 N wässriger HCl. Die Lösung wurde dreimal mit jeweils 25 ml Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet und zu einem öligen Extrakt einrotiert. Um dann das in dem Extrakt erhaltene Dimethylsuccinat vom Dimethylphenylitaconat zu trennen, wurde die Probe auf eine Silicagel-Säule gegeben und mit einem Gemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat (1:1, vol/vol) das Dimethylphenylitaconat von Verunreinigungen getrennt. Das Eluat wurde erneut zu einem öligen Extrakt einrotiert. Diesen Extrakt löste man 15 ml Methanol, gab dann 25 ml einer 15%igen Lösung von NaOH in Methanol dazu und kochte die Mischung unter Rücklaufkühlung für zwölf Stunden. Man rotierte die daraus resultierende Suspension ein und nahm sie dann in 38 ml H₂O_{bidest} auf. Danach wurde die wässrige Lösung dreimal mit jeweils 25 ml Ethylacetat gewaschen, mit konzentrierter HCl auf pH 3 angesäuert und die organische Phase dreimal mit jeweils 25 ml Ethylacetat extrahiert. Diese trocknete man mit Na₂SO₄ und konzentrierte sie mit einem Rotationsverdampfer 6 bis 9 fach an. Mit einem Gemisch aus Ethylacetat und Hexan (1:1, vol/vol) kristallisierte man bei 4°C über Nacht aus der ankonzentrierten organischen Phase (*E*)-Phenylitaconat als einen weißen, leicht gelblichen Feststoff aus. (*E*)-Phenylitaconat wurde mit Hexan gewaschen und anschließend im Trockenschrank bei 60°C getrocknet. (*E*)-Phenylitaconat wurde bei -80°C aufbewahrt.

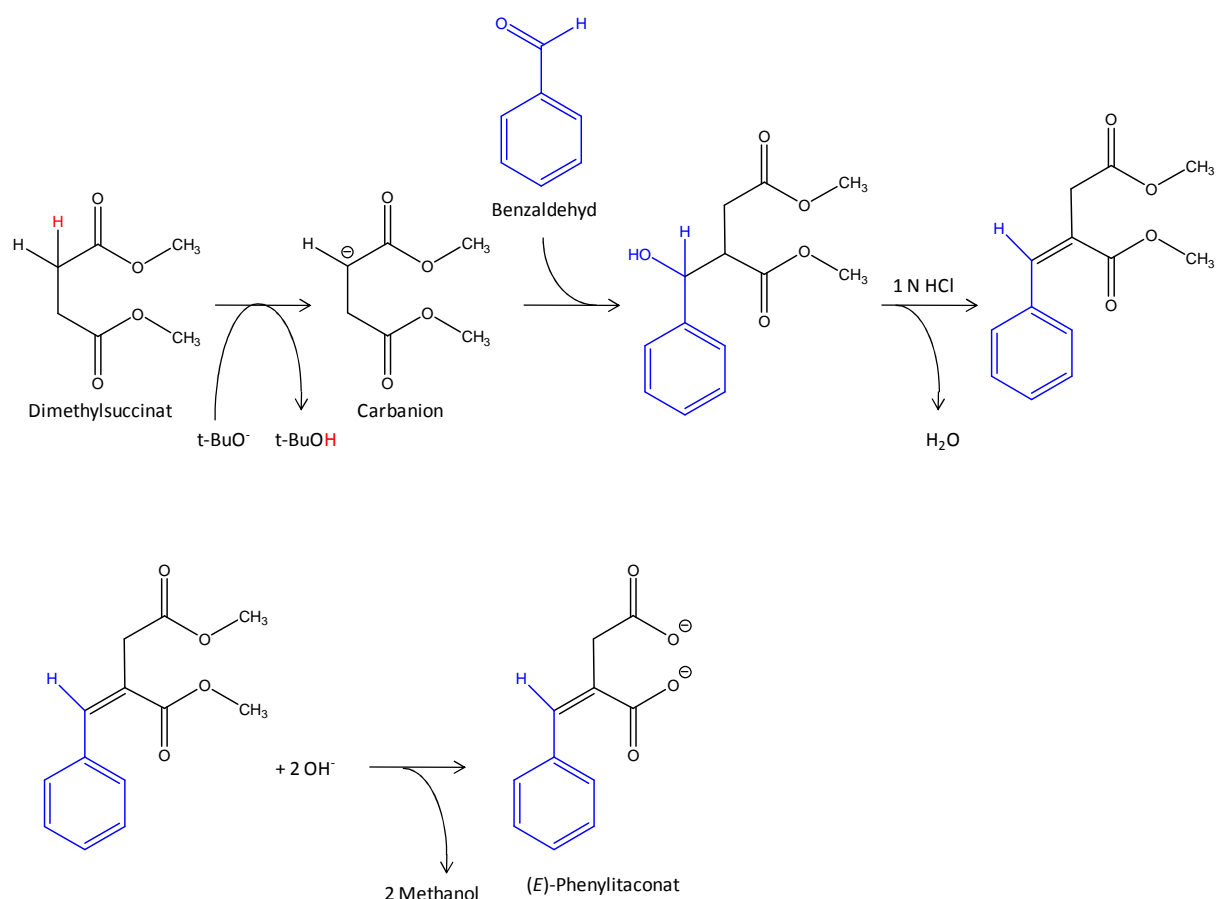


Abb 3: Syntheseweg von (E)-Phenylitaconat (Ravinia et al., 2002). Zunächst wird das azide Wasserstoffatom am Dimethylsuccinat vom *tert*-Butanolat ($t\text{-BuO}^-$) nukleophil angegriffen und ein Proton abstrahiert. Dabei entsteht neben *tert*-Butanol ein Carbanion, welches das elektrophile Kohlenstoffatom des Benzaldehyds nukleophil angreift und kovalent daran addiert. Man eliminiert die Hydroxylgruppe des entstandenen Intermediates durch saure Hydrolyse. Durch alkalische Lyse werden im letzten Schritt die Methylschutzgruppen der Carboxylgruppen entfernt.

8.2 Synthese von Benzylfumarat

Die Synthese von Benzylfumarat erfolgte nach dem Protokoll von Frost et al. (1995). 12 mmol (6 ml) einer 2 N Lösung Benzylmagnesiumchlorid in trockenem Tetrahydrofuran wurde tropfenweise über zehn Minuten zu einer Lösung aus 12 mmol (2,28 g) CuI in 25 ml trockenem Tetrahydrofuran gegeben. Die Temperatur betrug -40°C und die Synthese fand unter Stickstoff-Atmosphäre statt. Die heterogene Lösung wurde anschließend für eine Stunde bei -40°C gerührt um dann schrittweise ein Gemisch aus 10 mmol (1,42 g) Dimethylacetylendicarboxylat in 5 ml trockenem Tetrahydrofuran hinzuzugeben. Dabei färbte sich die Lösung augenblicklich rot. Nach zwei Stunden rühren bei -40°C

unter Stickstoff-Atmosphäre wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 ml gesättigte NH_4Cl -Lösung gestoppt und der Ansatz langsam auf Raumtemperatur gewärmt. Man extrahierte dann die löslichen organischen Produkte dreimal mit jeweils 40 ml Diethylether und wusch die vereinigten organischen Phasen mit 100 ml gesättigter Kochsalzlösung. Die organische Phase wurde ankonzentriert und dann in 10 ml eines Gemischs aus Tetrahydrofuran und 10 mM wässriger NaOH (4:1, vol/vol) gelöst. Nachdem das Gemisch zwölf Stunden bei Raumtemperatur unter rühren inkubiert wurde, stoppte man die Reaktion durch Zugabe von 5 ml 1 N wässriger HCl. Benzylfumarat wurde jeweils dreimal mit 10 ml Diethylether extrahiert und die vereinigten Phasen mit 30 ml gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und zuletzt mittels Rotationsverdampfer ankonzentriert. Benzylfumarat wurde als ölige Substanz bei 4°C aufbewahrt.

8.3 Synthese von Benzylmaleat

Die Synthese von Benzylmaleat erfolgte nach dem Protokoll von Frost et al. (1995). 11,5 mmol (5,8 ml) einer 2 N Lösung Benzylmagnesiumchlorid in trockenem Tetrahydrofuran wurde tropfenweise über zehn Minuten zu einer Lösung aus 11,5 mmol (2,20 g) CuI in 40 ml trockenem Tetrahydrofuran gegeben. Die Temperatur betrug -40°C und die Synthese fand unter Stickstoff-Atmosphäre statt. Die heterogene Lösung wurde anschließend für eine Stunde bei -40°C gerührt um dann schrittweise ein Gemisch aus 9,61 mmol (2,48 g) Bis(trimethylsilyl)-Acetylendicarboxylat in 10 ml trockenem Tetrahydrofuran hinzuzugeben. Dabei färbte sich die Lösung augenblicklich dunkelrot. Nach zwei Stunden rühren bei -40°C unter Stickstoff-Atmosphäre wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 ml gesättigte NH_4Cl -Lösung gestoppt und sofort mit 1 N HCl auf pH 2 angesäuert. Man erwärmte die Lösung auf Raumtemperatur und extrahierte dann die organischen Produkte dreimal mit jeweils 40 ml Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und zuletzt mittels Rotationsverdampfer ankonzentriert. Benzylmaleat wurde als ölige Substanz bei 4°C aufbewahrt.

8.4 Synthese von Coenzym A-Thioestern

Für die Synthese von Co A-Thioestern wurden zunächst die entsprechenden Anhydride verwendet. Waren diese nicht kommerziell erhältlich wurden sie wie folgt hergestellt. 384 μmol der entsprechenden Säure wurden bei 80°C in 800 μl Essigsäure gelöst und anschließend 384 μmol (37 μl) Essigsäureanhydrid zugegeben. Man erhöhte die Temperatur auf 120°C und inkubierte den

Reaktionsansatz so lange unter rühren, bis die Essigsäure vollständig verdampft war. Essigsäure besitzt einen Siedepunkt von 118°C, Essigsäureanhydrid von 139°C (Dawson et al., 1986). Der daraus entstandene Anhydrid der eingesetzten Säure war bei 120°C flüssig und erstarrte beim abkühlen auf Raumtemperatur. Mit Hilfe eines Pistills wurde das Produkt zu einem feinen Pulver zermahlen und konnte dann für die Thioestersynthese verwendet werden. Dafür wurden der jeweilige Anhydrid und freies Co A in einem Verhältnis von 1,2 zu 1 in Bezug auf die Stoffmenge eingesetzt. 73,1 μmol des Anhydrids wurden in 1 ml wasserfreiem Acetonitril und 60,9 μmol (50 mg) Coenzym A Trilithiumsalz in 2 ml 1 M NaHCO_3 gelöst. Beide Ansätze wurden zusammen mit 7 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ zusammengegeben und der Reaktionsansatz für eine Stunde auf Eis inkubiert. Um die Umsetzung des freien Co A zum Thioester zu verfolgen wurden jeweils 10 μl der Probe mit 10 μl Ellmans-Reagenz auf einen weißen Faltenfilter gegeben und die Färbung mit der von freiem Co A und Ellmans-Reagenz verglichen. Ellmans-Reagenz besteht aus 20 mg DTNB und 30 mg KHCO_3 in 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst und zeigt in Verbindung mit freiem Co A ein leuchtend gelbe Farbe. Nachdem das freie Co A vollständig zum Thioester umgesetzt wurde, säuerte man den Reaktionsansatz mit 5 N HCl auf pH 1,5 bis 2 an und entgaste anschließend die Probe, um darin gelöstes CO_2 zu entfernen. Um den synthetisierten Thioester zu reinigen wurden Silica-basierende Octadecyl-Säulen verwendet (Sep Pak Vac 6 cc C18, Waters, Eschborn). Diese wurden zunächst mit 2 Säulenvolumen (10 ml) Methanol, gefolgt von 2 Säulenvolumen (10 ml) einem Gemisch aus Acetonitril, $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (1:1, vol/vol) und 0,1% TFA gewaschen und dann mit 2 Säulenvolumen (10 ml) $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ mit 0,1% TFA equilibriert. Nach dem Laden der Probe auf die Säule wurde zunächst mit einem Säulenvolumen (5 ml) $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ mit 0,1% TFA gewaschen und im Anschluss daran der Thioester mit einem Säulenvolumen (5 ml) des Gemischs aus Acetonitril, $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (1:1, vol/vol) und 0,1% TFA eluiert. Um die Konzentration an Thioester zu bestimmen wurden die Extinktion bei 259 nm bestimmt und mit Hilfe des jeweiligen Extinktionskoeffizienten ϵ_{259} und dem Lambert-Beerschen Gesetz (Ergebnisse, Gleichung 3) berechnet. Anschließend aliquotierte man die Thioester zu jeweils 2 μmol , fro die Proben bei -80°C ein und entfernte dann das Acetonitril mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac Concentrator Savant, Thermo Scientific, Dreieich). Nachdem das Volumen der Aliquots um die Hälfte reduziert war, wurden die Proben erneut bei -80°C gefroren und mit eines Lyophyllisators (Alpha 1-4 LD, Christ, Osterode) über Nacht gefriergetrocknet. Die Thioester wurden bei -20°C gelagert.

9. Enzymatische Tests

9.1 Aktivitätsbestimmung der Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden photometrische Messungen durchgeführt. Dabei wurde zwischen der Hinreaktion der Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase, also der Oxidation von Benzylsuccinyl-CoA und der Rückreaktion der Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase, der Reduktion von Phenylitaconyl-CoA unterschieden.

9.1.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität der Hinreaktion

Als künstlicher Elektronenakzeptor diente Ferroceniumhexafluorophosphat (FcPF_6) in einer Konzentration von 200 μM und die Extinktionsänderung des FcPF_6 durch Reduktion wurde bei 300 nm Wellenlänge mittels Photometer (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies, Böblingen) aufgezeichnet (Tab. 37). Die Temperatur betrug, wenn nicht anders angegeben, 30°C und es herrschten aerobe Bedingungen. Die Reaktion wurde jeweils durch die Zugabe der entsprechenden Substratmenge zu den restlichen Komponenten gestartet und eine Quarzküvette verwendet.

Tab. 39: Zusammensetzung des Enzym-Assays der Hinreaktion.

Komponente	Konzentration Stocklösung	Konzentration im Assay
FcPF_6	2 mM	200 μM
Benzylsuccinyl-CoA	2 mM	100 μM
Enzym	0,5 mg ml ⁻¹ – 2 mg ml ⁻¹	10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ – 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Tris/HCl pH 7,0	100 mM	100 mM

9.1.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität der Rückreaktion

Als künstlicher Elektronendonator diente Methylviologen in einer Konzentration von 100 μM und die Extinktionsänderung des Methylviologen durch Oxidation wurde bei 600 nm Wellenlänge mittels Photometer (Speckol 1500, Analytik Jena, Jena) unter anaeroben Bedingungen aufgezeichnet (Tab. 38). Um Methylviologen zu Beginn des Assays im reduzierten Zustand vorliegen zu haben, wurde dieses mit Hilfe von 10 mM Natriumdithionit titriert. Die Temperatur betrug, wenn nicht anders angegeben, 30°C und die Reaktion wurde jeweils durch die Zugabe der entsprechenden Substratmenge zu den restlichen Komponenten gestartet.

Tab. 40: Zusammensetzung des Enzym-Assays der Rückreaktion

Komponente	Konzentration der Stocklösung	Konzentration im Assay
Methylviologen	10 mM	100 μM
Phenylitaconyl-CoA	5 mM	50 μM
Enzym	0,1 mg ml ⁻¹ – 0,5 mg ml ⁻¹	1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ – 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Tris/HCl pH 7,0	100 mM	100 mM

9.2 Aktivitätsbestimmung des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden photometrische Messungen durchgeführt. Dabei diente Iodnitrotetrazoliumchlorid als künstlicher Elektronenakzeptor und NADH als Substrat. Die Messungen wurden bei 30°C unter aeroben Bedingungen durchgeführt und die Extinktionsänderung bei 492 nm Wellenlänge mittels Photometer (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies, Böblingen) aufgenommen (Tab. 41). Die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe von Substrat gestartet.

Tab. 41: Zusammensetzung des Enzym-Assays

Komponente	Konzentration der Stocklösung	Konzentration im Assay
Iodnitrotetrazoliumchlorid	10 mM	1 mM
NADH	10 mM	100 μ M
Enzym	0,5 mg ml ⁻¹ – 3 mg ml ⁻¹	20 μ g ml ⁻¹ – 200 μ g ml ⁻¹
Tris/HCl pH 7,5	100 mM	100 mM

9.3 Enzymassays zur Bifurkation von Elektronen

Um zu untersuchen, ob es sich bei den in dieser Arbeit charakterisierten Elektronen-Transferierenden Flavoproteinen um bifurkierende Enzyme handelt, wurde der folgende photometrische Enzym-Assay verwendet. Die eingesetzten Enzyme waren Elektronen-Transferierenden Flavoproteine und Acyl-CoA Dehydrogenasen aus unterschiedlichen Organismen, die dann in diversen Kombinationen auf Interaktion untereinander untersucht wurden. Als Substrat diente die oxidierte Form des jeweiligen CoA-Esters der Dehydrogenase, Elektronendonator war NADH und zwecks Bifurkation wurde außerdem Ferredoxin eingesetzt. Zur Regeneration des Ferredoxin, welches bei der Bifurkationsreaktion reduziert wurde, nutzte man eine Hydrogenase um das Ferredoxin unter Bildung von Wasserstoff zu oxidieren. Die Enzymaktivität wurde durch die Extinktionsänderung bei 340 nm Wellenlänge mittels Photometer (Speckol 1500, Analytik Jena, Jena) beobachtet, was der Oxidation von NADH zu NAD⁺ entsprach. Alle Versuche dazu fanden unter anaeroben Bedingungen bei 30°C statt und die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe des entsprechenden Substrats gestartet.

10. Analytische Methoden

10.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford et al. (1976) durchgeführt. Als Referenzprotein für die Erstellung einer Standardkurve verwendetet man Rinderserumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Die Färbung der Referenzproteine sowie der

Proben wurde mit einer Färbelösung (Protein Assay, Bio-Rad, München) durchgeführt und anschließend die Proteinkonzentration bei 595 nm Wellenlänge mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Spektrophotometers (μ Quant, Bio-Tek Instruments Inc., Bad Friedrichshall) bestimmt.

10.2 Dünnschichtchromatographie

Zur Charakterisierung des Kofaktors des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens* wurden der gelbe Überstand des denaturierten Proteins zusammen mit unterschiedlichen Flavinen punktuell in einem Abstand von 1 cm zur unteren Kante auf eine Kieselgelplatte (TLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt) aufgetragen. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Methanol (75% v/v), Toluol (20% v/v) und Eisessig (5% v/v) mit dem die beladene Platte in einem geschlossenen Glasgefäß inkubiert wurde. Das Lösemittelgemisch bedeckte dabei den Boden in einer Höhe von 0,5 cm. Nachdem die Laufront des Lösemittelgemischs 0,5 cm vor der oberen Kante angekommen war, wurde die Silikagel-Platte aus dem Glasgefäß herausgenommen, mit Hilfe eines Föhns getrocknet und anschließend unter UV-Licht ausgewertet.

10.3 Colorimetrische Sulfidbestimmung (nach Cline, 1969)

Die Bestimmung der Konzentration an Sulfid im Medium vom *D. toluolica* wurde unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Zunächst erstellte man mit einer Na₂S-Lösung eine Standardkurve und ermittelte dann Anhand der daraus resultierenden Geradengleichung die Konzentration an Sulfid im Medium. Als Reagenz für diesen Test diente ein Gemisch aus 1 g N,N-Dimethyl-p-Phenylendiammonium-Dichlorid (DMPD) und 1,5 g FeCl₃ * 6 H₂O in 50 ml 25%iger HCl.

Erstellen der Standardkurve. Als Standard an Sulfid diente eine anaerobe 5 mM Na₂S-Lösung. Zur Herstellung dieser Lösung wurden 500 ml anaerobes H₂O_{bidest} mit einem NaOH-Plättchen versetzt und anschließend 0,6 g Na₂S * 9 H₂O zugegeben. Die Standardlösung wurde immer frisch angesetzt, da man diese maximal einen Tag verwenden sollte. Für die Standardkurve verwendete man sechs unterschiedliche Mengen an Sulfid (0 μ mol, 10 μ mol, 25 mmol, 50 μ mol, 100 μ mol und 250 mmol) und führte jeweils eine Doppelbestimmung durch. In zwölf Reagenzgläser wurden jeweils 5 ml anaerobes H₂O_{bidest} vorgelegt und dann die entsprechenden Volumina an Na₂S-Standardlösung zugegeben. Man vortexte kurz, gab dann augenblicklich 400 μ l des Reagenz in alle Ansätze, vortexte erneut und wartete 20 Minuten. Anschließend bestimmte die Extinktion bei 670 nm gegen einen Ansatz ohne Sulfidlösung.

Messen der Proben. Für die Bestimmung der Sulfidkonzentration im Medium wurden zu entsprechenden Zeitpunkten unter anaeroben Bedingungen Proben entnommen, diese abzentrifugiert und der Überstand für die Doppelbestimmung eingesetzt. Dabei wurde ähnlich vorgegangen wie bei der Erstellung der Standardkurve und es wurden jeweils drei unterschiedliche Volumina des Überstands zugegeben.

10.4 Reversed-phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

Mit Hilfe der Hochleistungschromatographie wurden unterschiedliche Syntheseprodukte auf ihre Reinheit überprüft. Außerdem wurde die Methode verwendet, um unterschiedliche Flavine zu trennen und im Überstand denaturierter Proteine nachzuweisen. Dazu wurde ein HPLC-System der Firma Sykam (Fürstenfeldbruck) mit einem gekoppelten Dioden-Array- Detektor (Variodetect UV DAD, Sykam) verwendet. Proben wie (*R*)-Benzylsuccinat, (*E*)-Phenylitaconat und die entsprechenden CoA-Ester wurden isokratisch mit 20% Acetonitril (v/v) und 0,1% TFA (v/v) als Laufmittel über 30 min unter Verwendung einer RP-C18-Säule (Supelcosil® LC-DABS, 150 x 4,6 mm, 3 µm; Sigma Aldrich, Steinheim) aufgetrennt und bei einer Wellenlänge von 210 nm detektiert. Die Flussrate bei den beschriebenen Läufen betrug 0,75 ml min⁻¹. Für die Trennung von unterschiedlichen Flavinen wie FAD, FMN und Riboflavin wurde ein isokratischer Gradient von 20% Acetonitril in Schwelsäure verwendet. Die HPLC-Läufe wurden mit Hilfe der Software „ChromStar 7“ (SCPA, Weyhe-Leeste) ausgewertet.

11. Spektroskopische Methoden

11.1 UV/Vis Spektroskopie

Die UV/Vis-Absorptionsspektren der Proteinproben wurden mit einem Spektral-Photometer (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies, Böblingen) aufgenommen und über einen Wellenlängenbereich von 200 nm bis 800 nm gescannt. Die Messungen wurden in Quartzküvetten durchgeführt und gegen den entsprechenden Puffer der Proteinlösung gemessen.

11.2 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die Messungen zur Kernspinresonanzspektroskopie wurden an einem Spektrometer (Avance 300, Bruker Daltonik, Bremen) der NMR-Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg gemessen. Die Ergebnisse wurde mit dem Program TopSpin 3.1 der Firma Bruker ausgewertet.

12. Spektrometrische Methoden

12.1 Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der exakten Masse von Proteinen wurde die Elektrospray Ionisation (ESI) verwendet. Die Messungen wurden von der Massenspektrometrie-Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt und dabei ein Masenspektrometer LTQ-FT der Firma Thermo Fischer Scientific (Dreieich) verwendet.

13. Proteinkristallisation und Strukturlösung

13.1 Proteinkristallisation des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens*

Erstes Screening. Zunächst erfolgte ein erstes Screening mit 768 unterschiedlichen Bedingungen mit Kits im 96-well Format (Tab. 42) der Firma Qiagen (Hilden). Die Proteinkonzentration betrug für jede Bedingung 10 mg/ml und 5 mg/ml, die Kristallisation wurde die Sitting Drop-Methode verwendet und die Temperaturen der Kristallisation lagen bei 4°C und 18°C. Für das pipettieren der unterschiedlichen Bedingungen (300 nl) in die Kristallisationsplatten und das Zugabe der Proteinlösung (300 nl) wurde ein Kristallisationsroboter (Cartesian Microsys TM SQ 4000) verwendet. Bedingungen mit erfolgreichen Kristallisationsansätzen wurden dann für eine Optimierung verwendet.

Tab. 42: Verwendete Kristallisationsbedingungen des ersten Screenings

Kristallisations-Bedingung	Erfolgreiche Kristallisationsbedingung
Classic Suite	nein
Classic Lite Suite	nein
MbClassI Suite	nein
MbClassII Suite	nein
JCSG CoreI Suite	ja
JCSG CoreII Suite	ja
JCSG CoreIII Suite	ja
JCSG CoreIV Suite	ja

Erste Optimierung. Für die Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurde einige erfolgreiche Bedingungen aus den unterschiedlichen JCSG Core Suites verglichen und entsprechend die Optimierung vorbereitet (Material und Methoden, Tab. 43). Für das pipettieren wurde ein

Kristallisationsroboter (Honeybee 963™, Digilab, Holliston, MA) verwendet, 300 nl Protein (10 mg/ml und 20 mg/ml) und 300 nl Bedingung wurden in der Sitting Drop-Methode zusammengegeben und die Inkubation erfolgte bei 4°C und bei 18°C.

Tab. 43: Bedingungen der ersten Optimierung. Die unterschiedlichen Komponenten wurden jeweils miteinander kombiniert, so dass 81 unterschiedliche Ansätze vorhanden waren.

Komponente	Variation im Kristallisationsansatz
0,1 M MES	pH 5,4, pH 6,0 und pH 6,6
PEG 6000	15%, 20% und 25%
PEG 8000	15%, 20% und 25%
PEG 10000	15%, 20% und 25%
Calciumacetat	0,1 M, 0,2 M und 0,3 M

Zweite Optimierung. Da die erste Optimierung nicht erfolgreich war, wurde eine weitere Optimierung angesetzt. Hier wurden neben anderen Bedingungen (Material und Methoden, Tab 42) auch auf das sogenannte Seeding zurückgegriffen. Dabei wurden bereits vorhandene Kristalle fein zerstoßen, mittels Katzenhaar aufgenommen und damit durch den fertigen Kristallisationsansatz gestrichen. Diese Methode war äußerst erfolgreich und wurde in allen weiteren Ansätzen verwendet. Für diese Optimierung wurden die Ansätze per Hand pipettiert, jeweils 1 µl Protein (10 mg/ml und 20 mg/ml) und 1 µl Bedingung wurden zusammen mit der Hanging Drop-Methode bei 4°C und 18°C inkubiert.

Tab. 44: Bedingungen der zweiten Optimierung. Die unterschiedlichen Komponenten wurden jeweils miteinander kombiniert, so dass 24 unterschiedliche Ansätze vorhanden waren.

Komponente	Variation im Kristallisationsansatz
0,1 M HEPES	pH 6,0, pH 6,5, pH 7,0 und pH 7,5
PEG 3350	15%, 20% und 25%
PEG 6000	15%, 20% und 25%

Dritte Optimierung. Als letzter Schritt wurde eine weitere Optimierung durchgeführt, welche auf den bereits erfolgreichen Ansätzen der zweiten Optimierung beruhte. Für diese Optimierung (Material und Methoden, Tab. 45) wurden die Ansätze per Hand pipettiert, jeweils 1 µl Protein (10 mg/ml und 20 mg/ml) und 1µl Bedingung wurden zusammen mit der Hanging Drop-Methode bei 4°C und 18°C inkubiert.

Tab. 45: Bedingungen der dritten Optimierung. Die unterschiedlichen Komponenten wurden jeweils miteinander kombiniert, so dass 12 unterschiedliche Ansätze vorhanden waren.

Komponente	Variation im Kristallisationsansatz
0,1 M HEPES	pH 6,5 und pH 7,0
PEG 1000	15% und 20%
PEG 2000	15% und 20%
PEG 3350	15% und 20%

13.2 Schwermetallsoaking der Kristalle des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins

Um eine weitere Möglichkeit der Strukturlösung des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens* zu nutzen, wurden Kristalle mit unterschiedlichen Schwermetallen behandelt und anschließend analysiert. Neben den verschiedenen Schwermetallen wurde auch die Inkubationszeit der Kristalle in der Schwermetalllösung variiert (Tab. 46). Nachdem man die Kristalle in der Schwermetalllösung inkubiert hatte, wurden sie kurz in die jeweilige Kristallisationsbedingung

überführt um überschüssiges Schwermetall zu entfernen (sog. Backsoaking). Anschließend tauchte man die Kristalle in Cryo-Puffer (Bedingung mit 30% Glycerin) und fror sie in flüssigem Stickstoff weg.

Tab. 46: Verwendete Schwermetalle und entsprechende Bedingungen.

Schwermetall	Zeitraum der Inkubation
5 mM Thiomersal	2 Stunden, 4 Stunden und 8 Stunden
5 mM Ethyl-Quecksilber-Phosphat	15 Minuten, 30 Minuten und 1 Stunde
5 mM Kaliumtetrachloroplatinat	2 Stunden, 4 Stunden und 8 Stunden

V. Ergebnisse

1. Enzyme der β -Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinat

Im anaeroben Toluolabbau wird durch das Enzym (*R*)-Benzylsuccinat Synthase zunächst aus Toluol und Fumarat (*R*)-Benzylsuccinat gebildet und anschließend zum CoA-Thioester aktiviert. Dieser erste Schritt der β -Oxidation wird von einer Succinyl-CoA-abhängigen CoA Transferase katalysiert und generiert (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA (Leutwein und Heider 2000). Anschließend oxidiert das Enzym (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA zu (*E*)-Phenylitaconyl-CoA. Dieses Enzym war bislang nur in dem denitrifizierenden Organismus *Thauera aromatica* untersucht, nicht jedoch in den strikt anaeroben Arten *Desulfobacula toluolica* oder *Geobacter metallireducens*. Vermutlich gibt es bei dieser Reaktion Unterschiede in der Elektronenweiterleitung, an der ein Elektronen-Transferierendes Flavoprotein sowie ein unbekanntes Membranprotein beteiligt sind.

In dieser Arbeit wurden deshalb die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenasen und die zugehörigen Elektronen-Transferierenden Flavoproteine aus *Geobacter metallireducens* und *Desulfobacula toluolica* biochemisch charakterisiert und mit Acyl-CoA Dehydrogenasen und Elektronen-Transferierenden Flavoproteinen aus anderen Organismen verglichen. Desweiteren wurde die Struktur des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins von *G. metallireducens* mittels Röntgenstrukturanalyse gelöst.

1.1 *in silico* Charakterisierung des *bss*- und *bbs*-Operons

1.1.1 Untersuchungen zum *bbs*-Operon

Die Proteine, die den anaeroben Abbau von Toluol katalysieren, werden durch die Gene des sogenannten *bbs*-Operon codiert (Leuthner und Heider, 2000). In fakultativ anaeroben Organismen wie *T. aromatica* ist der Abbau von Benzylsuccinat zu Benzoyl-CoA bereits gut untersucht und die beteiligten Enzyme charakterisiert. Um die entsprechenden Abbauwege und beteiligten Enzyme aus obligat anaeroben Organismen wie *G. metallireducens* und *D. toluolica* zu charakterisieren, wurde in

einem ersten Schritt die genetischen Informationen mit denen aus fakultativ anaeroben Organismen verglichen. Dabei wurden zunächst die einzelnen *bbs*-Operons untersucht (Abb. 4).

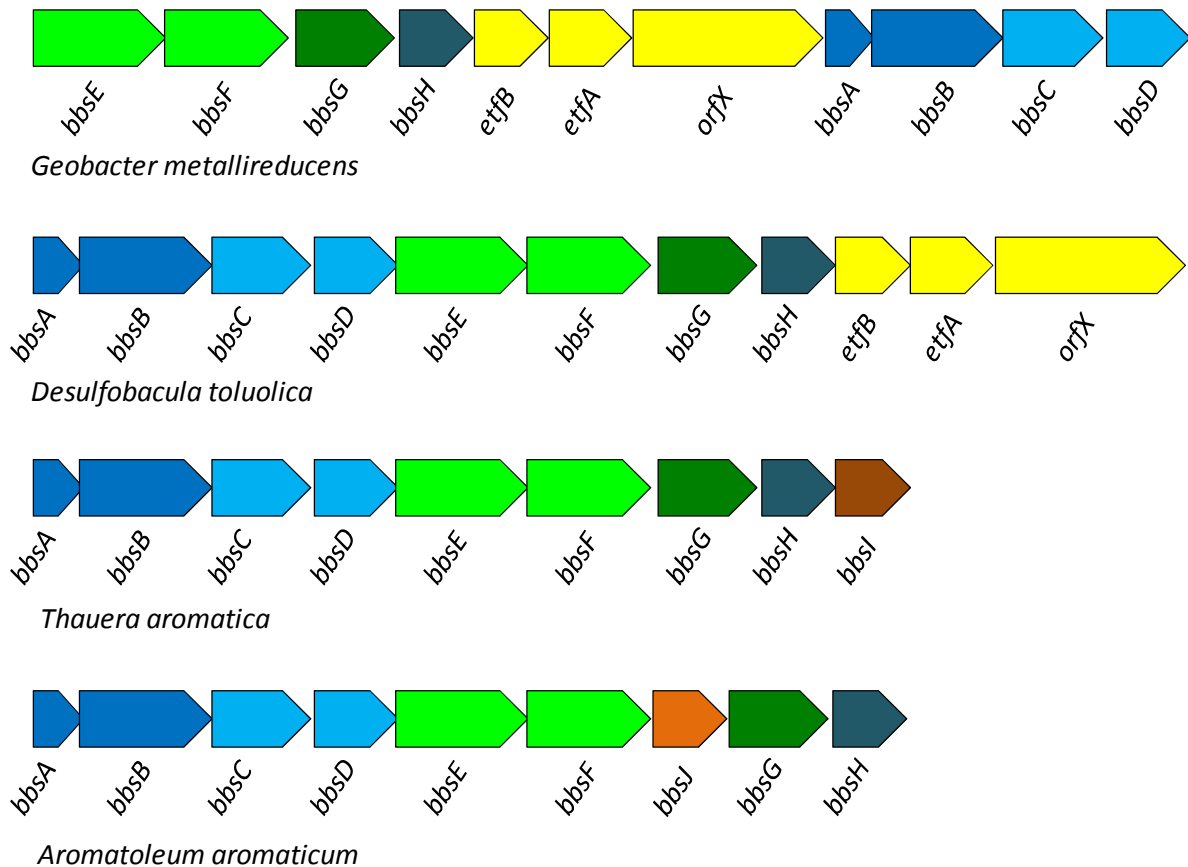


Abb. 4: Vergleich der *bbs*-Operons aus verschiedenen Organismen. Dargestellt ist die Anordnung der einzelnen Gene des *bbs*-Operon in fakultativ aeroben Organismen wie *T. aromatica* und *Aromatoleum aromaticum* und obligat anaeroben Organismen wie *G. metallireducens* und *D. toluolica*.

Der Vergleich zeigte, dass die Anordnung der Gene im Operon in allen vier Organismen unterschiedlich war. Die Operons der beiden fakultativ anaeroben Bakterien glichen sich in der Anzahl der vorhandenen Gene, hier war lediglich in *T. aromatica* das Gene *bbsI* vorhanden und in *A. aromaticum* stattdessen das Gen *bbsI*. Beim Vergleich von fakultativ Anaeroben mit obligat Anaeroben zeigten sich deutliche Unterschiede. Die obligat Anaeroben besaßen drei zusätzliche Gene, die bei den fakultativ Anaeroben nicht vorhanden waren. Die Gene waren *etfB* und *etfA*, die für die beiden Untereinheiten eines Elektronen-Transferierenden Flavoproteins kodierten sowie das Gen *orfX*. Das Produkt dieses Gens war bislang nicht charakterisiert. Außerdem fehlte in *G*

metallireducens und *D. toluolica* die Gene *bbsI* und *bbsJ*. Die Orientierung der Gene in beiden Organismen war ebenfalls unterschiedlich. In *G. metallireducens* lagen die Gene *bbsA*, *bbsB*, *bbsC* und *bbsD* am Anfang des Operons und in *D. toluolica* lagen diese vier Gene am Ende. Während dieser Arbeit wurde von Herrn Professor Rabus herausgefunden, dass im Genom von *D. toluolica* zwei vollständige *bbs*-Operons vorhanden sind (unveröffentlichte Daten). Diese unterscheiden sich weder in Anzahl noch in der Orientierung der Gene.

1.1.2 Sequenzierung des *bss*- und *bbs*-Operons aus *D. toluolica*

Mit Hilfe von degenerierten Primern, die aus dem Genom von *G. metallireducens* abgeleitet wurden, wurden Teile des *bss*- und *bbs*-Operons aus *D. toluolica* amplifiziert und diese anschließend sequenziert. Für das *bss*-Operon war eine partielle Sequenz des *bssA*-Gens für die große Untereinheit der (R)-Benzylsuccinat Synthase (*bbsA*) bereits in der Datenbank vorhanden. Hierfür wurden die Primer direkt abgeleitet.

Die Abbildung 5 und 6 zeigen die jeweils mittels PCR amplifizierten Bereiche der entsprechenden Operons. Diese Bereiche wurden mittels PCR amplifiziert und anschließend mit unterschiedlichen Primern sequenziert (Material und Methoden 2.). Für das *bss*-Operon wurden die Sequenzen der Gene der beiden anderen Untereinheiten der (R)-Benzylsuccinat Synthase (*bssC* und *bssB*) sowie die Sequenz des Gens des aktivierenden Enzyms ermittelt. Für das *bbs*-Operon wurden die Sequenzen der Gene der beiden Untereinheiten der Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase (*bbsA* und *bbsB*) ermittelt. Die Sequenzen sind im Anhang dieser Arbeit abgebildet. Da im Verlauf dieser Arbeit die Sequenzen der *bss*- und *bbs*-Operons aus der Genomsequenz aus *D. toluolica* zugänglich wurden, wurden die weiteren Arbeiten an dieser Stelle beendet.

Beim Vergleich der sequenzierten *bss*- und *bbs*-Gene aus *D. toluolica* mit den bekannten Sequenzen aus *G. metallireducens* ergab sich für das Gen des Aktivierenden Enzyms *bssD* eine Sequenzidentität von 53%. Für die Gene der beiden kleinen Untereinheiten der Benzylsuccinat Synthase *bssC* und *bssB* ergaben sich Sequenzidentitäten von 51% und bzw. 71%. Für die Gene der beiden Untereinheiten der Benzoyl-Succinyl-CoA Thiolase *bbsA* und *bbsB* ergaben sich Sequenzidentität von 67% bzw. 76%.

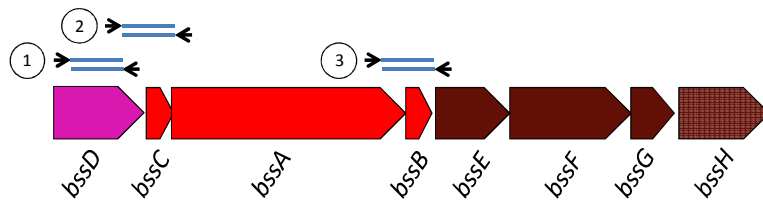


Abb. 5: Sequenzierung des *bss*-Operon aus *D. toluolica*. Für die Sequenzierung wurden 3 unterschiedliche PCR-Produkte analysiert. (1): PCR-Produkt des Primerpaares *bssD*/*bssDrev1*. (2): PCR-Produkt des Primerpaares *bssD2*/*bssArev*. (3): PCR-Produkt des Primerpaares *bssA*/*bssEback*.

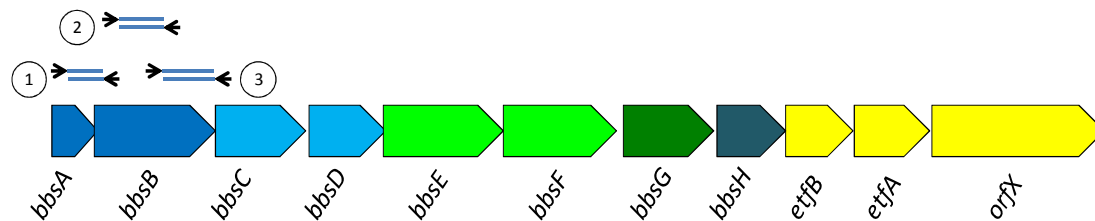


Abb. 6: Sequenzierung des *bbs*-Operon aus *D. toluolica*. Für die Sequenzierung wurden 3 unterschiedliche PCR-Produkte analysiert. (1): PCR-Produkt des Primerpaares *bbsA*/*bbsA1*. (2): PCR-Produkt des Primerpaares *bbsB1*/*bbsA2*. (3): PCR-Produkt des Primerpaares *bbsB2*/*bbsC1rev*.

1.1.3 Untersuchungen zum OrfX (Gmet_1527) aus *G. metallireducens*

Die Versuche das von *orfX* kodierte Protein rekombinant herzustellen waren nicht erfolgreich. Weder das vollständige Protein noch ein verkürztes Protein ohne Transmembranteil konnte heterolog in *E. coli* produziert werden. Auch eine Reinigung des nativen Proteins war bislang nicht erfolgreich, weshalb eine biochemische Charakterisierung nicht möglich war. Daher wurde mit den vorhandenen Daten eine *in silico*-Analyse vorgenommen. Dabei wurde die Aminosäuresequenz mit Hilfe von Programmen zur Vorhersage von Transmembranbereichen in Proteinen (TMHMM Server v. 2.0, Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark; TMPred, European Molecular Biology Network, Swiss node) analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem Enzym um ein Membranprotein mit mindestens fünf Transmembranhelices handelt. Die Vorhersagen unterschiedlicher Programme waren diesbezüglich nicht einheitlich (Abb. 7). Der TMHMM Server sagte für den Bereich von Aminosäure 50 bis 74 eine Transmembranhelix voraus (gesamt 6

Transmembranhelices), während der TMpred Server diesen Abschnitt nicht als Transmembranbereich erkannte (gesamt 5 Transmembranhelices). Laut Analyse stellt die N-terminale Hälfte des Proteins den Transmembranbereich dar, der sich über einen Bereich von 240 Aminosäuren erstreckt. Bei beiden Programmen beginnt der N-Terminus des Proteins auf der periplasmatischen Seite der Membran. Dies würde bedeuten, dass der C-Terminus je nach Anzahl der Transmembranhelices im Cytoplasma oder im Periplasma lokalisiert wäre.

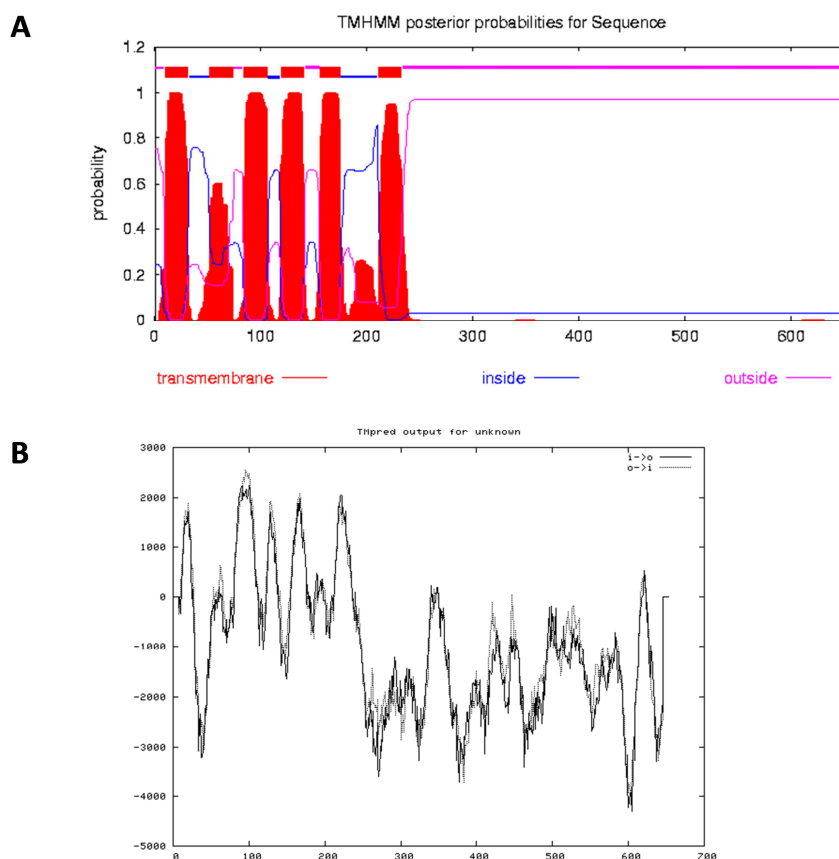


Abb. 7: Transmembran Vorhersage für die Aminosäuresequenz des OrfX aus *G. metallireducens*. A: Vorhersage des TMHMM Servers v. 2.0. Die Y-Achse gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine Transmembranhelix vorliegt. Die X-Achse gibt die Nummer der Aminosäure des Proteins an. In rot sind die vorhergesagten Transmembranbereiche gekennzeichnet. Die blaue Linie zeigt den Bereich des Proteins, der im Cytoplasma liegt und die rosa Linie zeigt den Bereich des Proteins, der im Periplasma liegt. **B:** Vorhersage des TMpred Servers. Die X-Achse gibt die Nummer der Aminosäure des Proteins an. Je höher der Wert der Y-Achse ist, desto wahrscheinlicher ist ein Transmembranbereich an dieser Stelle des Proteins. Laut vorhersage liegt der N-Terminus außen (Periplasma).

Im C-terminalen Bereich befinden sich Bindemotive für zwei [4Fe-4S]-Cluster mit der Aminosäuresequenz CxxCxxCxxxC. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz mit weiteren *orfX*-Genprodukten aus *Geobacter*-Spezies und Sulfatreduzierern zeigte, dass diese Motive in allen untersuchten Sequenzen konserviert sind (Abb. 8). Desweiteren finden sich im Genom von *G. metallireducens* auch noch sieben weitere Gene, deren Produkte hohe Sequenzidentitäten (bis 35%) zu OrfX besitzen und nahezu alle benachbart zu *etfBA* Genen auftreten (Vgl. Tab. 47).

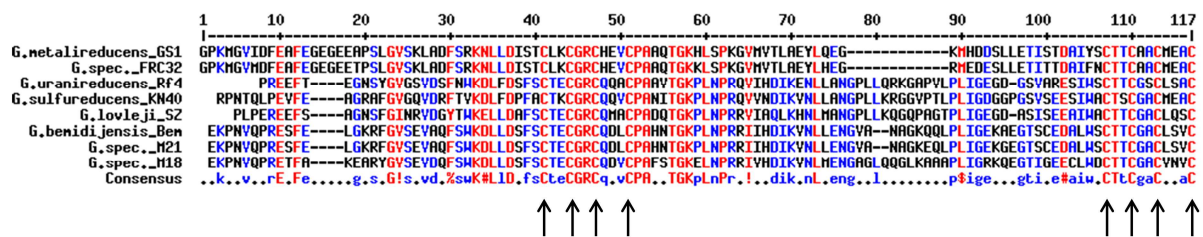


Abb. 8: Konservierte Cysteine in *orfX*-homologen Genen aus unterschiedlichen *Geobacter*-Spezies.

Die Pfeile markieren die konservierten Cysteine des CxxCxxCxxxC-Motivs.

Tab. 47: *orfX*-homologe Gene in *G. metallireducens* GS-15. Zusätzlich ist vermerkt, ob sich die Gene benachbart zu *etfBA* befinden.

Gen	Benachbart zu <i>etfBA</i>
Gmet_0685	ja
Gmet_1527	ja
Gmet_1714	ja
Gmet_2065	ja
Gmet_2070	nein
Gmet_2255	nein
Gmet_2264	ja
Gmet_2267	nein

1.2 Chemische Synthese von Substraten

1.2.1 Chemische Synthese von (*E*)-Phenylitaconat

(*E*)-Phenylitaconat wurde ausgehend von Benzaldehyd und Dimethylsuccinat nach Ravina et al. (2002) synthetisiert (Material und Methoden 8.1). Aus eingesetzten 35 mmol Benzaldehyd (3,8 g) und 44 mmol Dimethylsuccinat (6,4 g) wurden letztendlich etwa 28 mmol (*E*)-Phenylitaconat (5,9 g) als gelblich weißes Pulver erhalten. Die Ausbeute an (*E*)-Phenylitaconat nach wiederholter Synthese betrug 80%. (*E*)-Phenylitaconat wurde anschließend mittels NMR analysiert.

1.2.2 Chemische Synthese von Benzylsuccinyl-CoA und Phenylitaconyl-CoA

Substrat und Produkt der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase wurden zum Teil nach einem Protokoll von M. L. Lippert (2009) hergestellt. Als Ausgangsstoffe dienten dabei Benzylsuccinat und Phenylitaconat. DL-Benzylsuccinat wurde käuflich erworben während (*E*)-Phenylitaconat chemisch synthetisiert wurde (Material und Methoden 8.1). Zur Synthese der CoA-Thioester wurden die freien Säuren in die Säureanhydride überführt und mittels eines Protokolls von T. Selmer (2008) zu CoA-Thioestern umgesetzt (Material und Methoden 8.4). Die jeweiligen Produkte wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie analysiert. Die Ausbeute der synthetisierten CoA-Thioester lag zwischen 80 und 90%.

Synthese von Phenylitaconyl-CoA. Zur Synthese von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA wurde zunächst das Säureanhydrid erzeugt, indem (*E*)-Phenylitaconat mit einer äquimolaren Menge an Essigsäureanhydrid in Essigsäure gelöst und bei 120°C gekocht wurde. Aufgrund der verdunstenden Essigsäure wird das Reaktionsgleichgewicht bei fortschreitender Reaktion in Richtung des (*E*)-Phenylitaconsäure-Anhydrids verschoben. Nachdem die gesamte Essigsäure verdunstet war, blieb das (*E*)-Phenylitaconsäure-Anhydrid zunächst als flüssige Substanz und nach dem Abkühlen als grauer Feststoff zurück. Für die weitere Synthese wurde dieser Feststoff zu einem feinen Pulver verrieben und dann direkt verwendet beziehungsweise für spätere Verwendung bei -20°C auf Silikagel gelagert. Im nächsten Schritt wurde der CoA-Thioester nach Selmer (2007) hergestellt und das entstandene (*E*)-Phenylitaconyl-CoA mittels UV/Vis-Spektroskopie auf Reinheit untersucht (Abb. 9). Hier ließ sich ein Absorptionsmaximum bei 260 nm erkennen, sowie eine für Phenylitaconyl-CoA charakteristische Schulter bei 290 nm. Die Ausbeute der Synthese gemessen an eingesetzter Menge Coenzym A betrug

etwa 72% wobei freies Coenzym A nach der Synthese mittels DTNB-Lösung und entsprechender Extinktionsänderung bei 412 nm Wellenlänge bestimmt wurde.

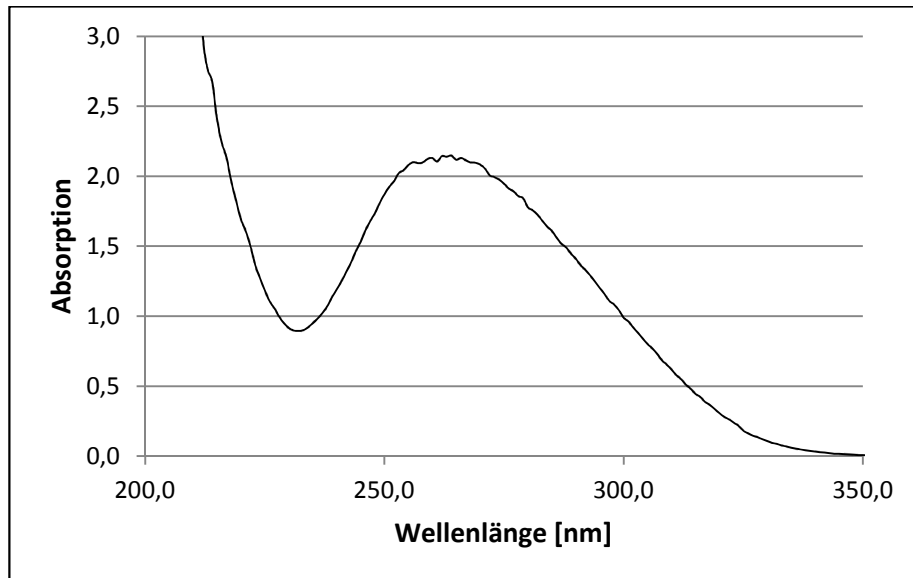


Abb. 9: UV/Vis-Spektrum des synthetisierten Phenylitaconyl-CoA. Der Peak im UV/Vis-Spektrum von Phenylitaconyl-CoA liegt bei 260 nm. Außerdem zeigt sich die für Phenylitaconyl-CoA typische Schulter bei 290 nm.

Synthese von Benzylsuccinyl-CoA. Die Synthese von Benzylsuccinyl-CoA wurde ähnlich wie die von Phenylitaconyl-CoA durchgeführt. Die dafür eingesetzte DL-Benzyl-bernsteinsäure wurde zuvor nicht stereospezifisch getrennt sondern als Razemat eingesetzt. Das entstandene Benzylsuccinyl-CoA wurde anschließend ebenfalls mittels UV/Vis-Spektroskopie analysiert (Abb. 10). Hier ließ sich ebenfalls ein Absorptionsmaximum bei 260 nm erkennen, jedoch keine Schulter bei 290 nm. Die Ausbeute betrug in diesem Fall 88%.

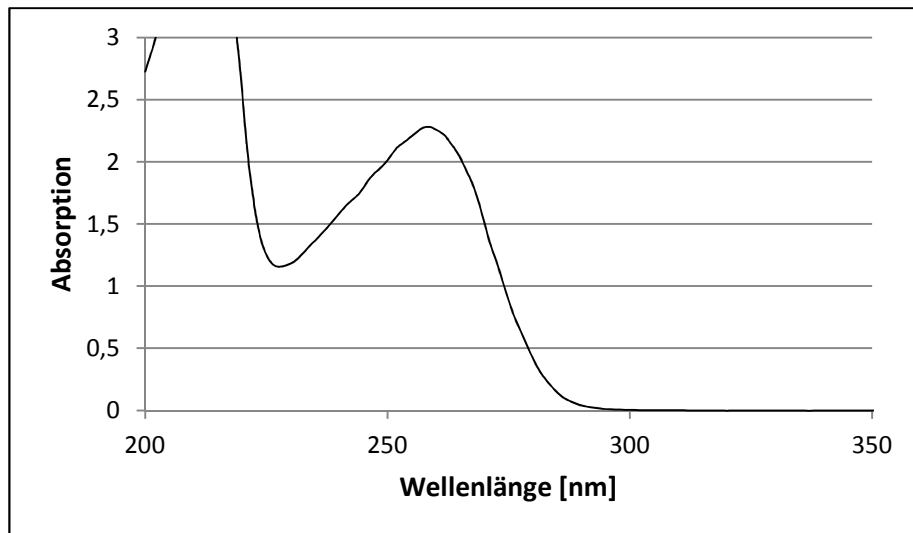


Abb. 10: UV/Vis-Spektrum des synthetisierten Benzylsuccinyl-CoA. Der Peak im UV/Vis-Spektrum von Benzylsuccinyl-CoA liegt bei 260 nm. Im Gegensatz zum Phenylitaconyl-CoA ist keine Schulter bei 290 nm zu erkennen.

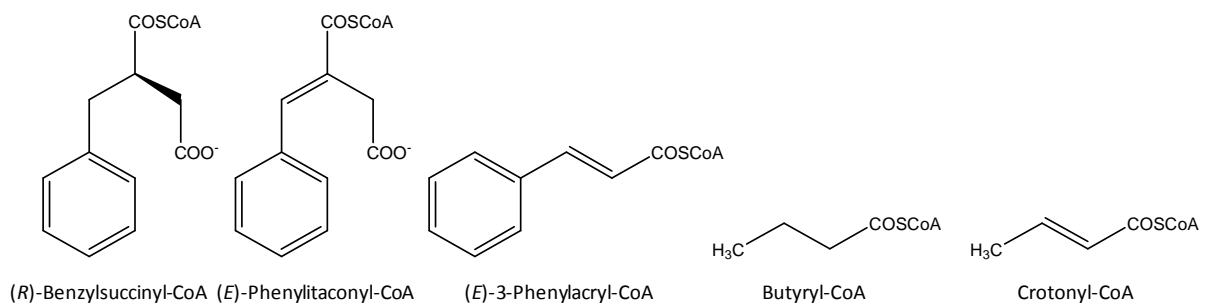


Abb. 11: Übersicht über die verwendeten Intermediate. In den entsprechenden Assays wurden (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA und Butyryl-CoA für die Hinreaktion eingesetzt und (*E*)-Phenylitaconyl-CoA, (*E*)-3-Phenylacryl-CoA und Crotonyl-CoA wurden für die Rückreaktion eingesetzt.

1.3 Charakterisierung der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *Geobacter metallireducens*

G. metallireducens diente in dieser Arbeit als Modellorganismus für *D. toluolica*, da er im Vergleich eine wesentlich höhere Wachstumsrate aufwies und dadurch eine höhere Ausbeute an Zellmasse erzielt wurde. Damit war es möglich das Wachstum auf Toluol und Benzoat zu vergleichen und entsprechend induzierte Proteine im Organismus zu untersuchen.

1.3.1 Wachstum von *G. metallireducens* auf Toluol und Benzoat.

Um die native (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *G. metallireducens* zu charakterisieren, wurde der Organismus zunächst auf Toluol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen. Das Wachstum fand unter anaeroben Bedingungen statt und als terminaler Elektronenakzeptor diente Nitrat. Als Kontrolle wurde *G. metallireducens* auch auf Benzoat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen, ebenfalls unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor. Das Wachstum auf Toluol wurde bei zwei unterschiedlichen Nitrat-Konzentrationen verfolgt, nämlich bei 15 mM und 5 mM. Der Zellextrakt wurde anschließend auf Aktivität der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase untersucht.

Die Zellen erreichten mit einer OD_{578} von 0,27 in den Kulturen auf Benzoat deutlich schneller die stationäre Phase als die Zellen auf Toluol (Abb. 12). Die Verdopplungszeit (t_D) betrug für das Wachstum auf Benzoat $t_D = 7$ Stunden und für das Wachstum auf Toluol $t_D = 43$ Stunden. Außerdem benötigten die Zellen auf Toluol nach etwa acht Tagen zusätzlich 5 mM Nitrat, da dieses nahezu vollständig verbraucht war. Die Zellen auf Benzoat dagegen erreichten die gleiche optische Dichte ohne zusätzliche Zugabe von Nitrat. Die Zellmasse betrug für die Zellen auf Benzoat 210 mg Feuchtzellen pro Liter Kultur und für Toluol 215 mg Feuchtzellen pro Liter Kultur.

Der Vergleich der anwesenden Proteine in Zellextrakten von Zellen, die auf Toluol oder Benzoat gewachsen sind, zeigte deutliche Unterschiede (Abb. 11). Bei den Zellen auf Toluol sind mehrere Banden induzierter Proteine zu erkennen, die bei Zellen auf Benzoat fehlen. Leider war es aufgrund der Vielzahl nicht möglich, die entsprechenden induzierten Proteine genauer zu charakterisieren.

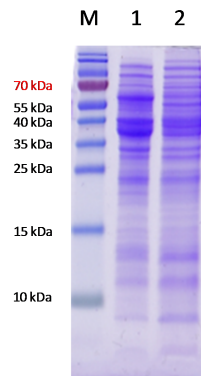


Abb. 11: SDS-PAGE der Zellextrakte von *G. metallireducens* auf Toluol oder Benzoat gewachsen. Zu sehen sind die Zellextrakte von Kulturen, die auf Toluol oder Benzoat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen sind. Die löslichen Proteine wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt. **M:** Massenstandard, **1:** Zellextrakt (Zellen auf Toluol gewachsen), **2:** Zellextrakt (Zellen auf Benzoat gewachsen)

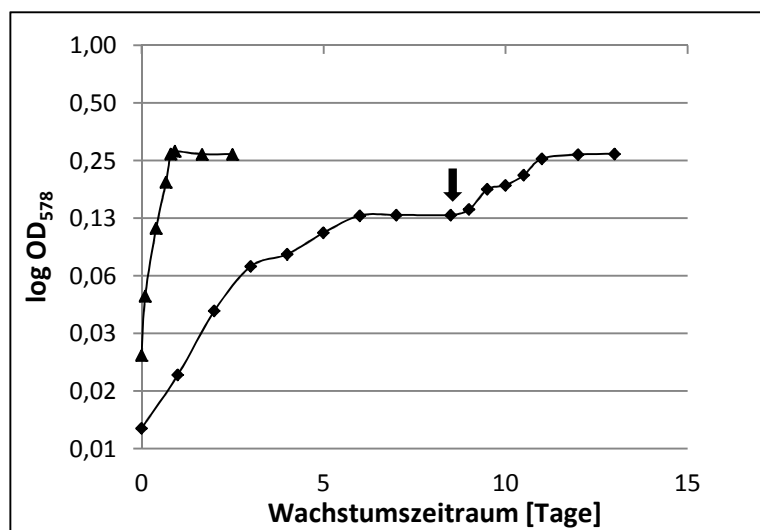


Abb. 12: Wachstumskurven von *G. metallireducens* auf Toluol und Benzoat. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurde jeweils die Optische Dichte bei 578 nm bestimmt. Die Konzentration von Toluol und Benzoat betrug jeweils 2 mM, die von Nitrat 5 mM. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt, an dem zur Kultur auf Toluol erneut 5 mM Nitrat zugegeben wurden. (▲) Zellen auf Benzoat gewachsen, (♦) Zellen auf Toluol gewachsen.

Der Vergleich der Kulturen auf Toluol, die je mit 5 mM oder 15 mM Nitrat gestartet wurden zeigte bereits relativ früh Unterschiede (Abb. 13). Zwar wuchsen beide Kulturen ähnlich gut an: die Verdopplungszeit der Kultur mit 5 mM Nitrat betrug $t_D = 40$ Stunden und die der Kultur mit 15 mM

Nitrat betrug $t_D = 63$ Stunden. Jedoch zeigte die Kultur mit der höheren Nitratkonzentration bereits nach den ersten 24 Stunden eine Nitritkonzentration von 0,1 mM. Im Verlauf von weiteren 48 Stunden stieg die Konzentration von Nitrit auf 0,8 mM an und blieb bis zur Zellernte nach elf Tagen konstant. Die Nitratkonzentration nahm im Laufe der ersten fünf Tage kontinuierlich auf etwa 12 mM ab, blieb dann aber im weiteren Verlauf konstant. Die Optische Dichte erreichte nach fünf Tagen ihr Maximum von 0,14, blieb dann über weitere drei Tage konstant und nahm anschließend innerhalb von drei Tagen wieder ab.

Die Kultur mit 5 mM Nitrat hatte dieses bei einer OD_{578} von 0,21 nach sieben Tagen vollständig verbraucht. Nitrit konnte zu keinem Zeitpunkt im Medium festgestellt werden. Nach einer weiteren Zugabe von 5 mM Nitrat stieg die OD_{578} innerhalb von vier Tagen auf 0,25 an. Deshalb kann man davon ausgehen, dass die Wachstumshemmung durch die Akkumulation von Nitrit in Anwesenheit von viel Nitrat zustande kommt, während Nitrit bei niedrigen Nitrat-Konzentrationen unter der Nachweis- bzw. Toxizitätsgrenze bleibt.

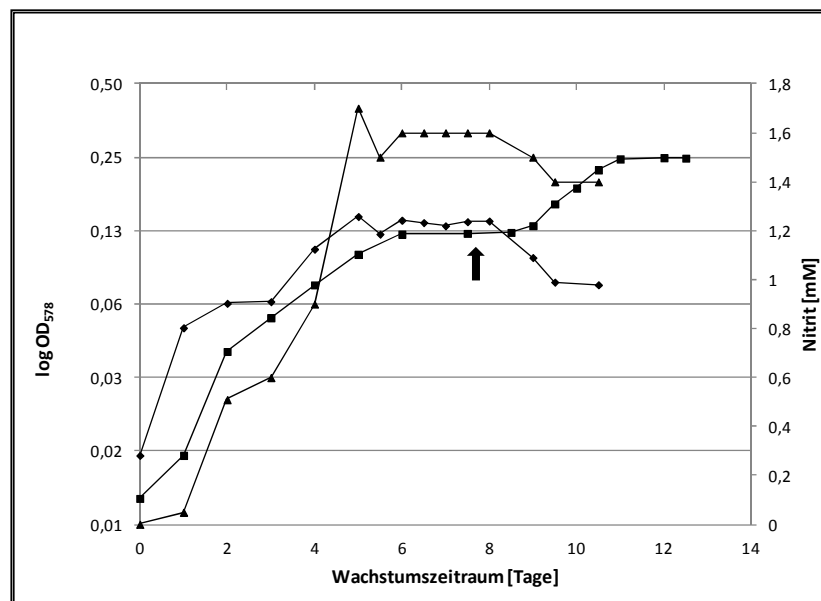


Abb. 13: Wachstum von *G. metallireducens* bei unterschiedlichen Nitratkonzentrationen. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurde jeweils die Optische Dichte bei 578 nm bestimmt. Die Konzentration an Toluol betrug 2 mM. Die Nitritkonzentration ist für die Kultur mit 15 mM Nitrat angegeben. Bei der Nitrat Kultur mit 5 mM konnte kein Nitrit nachgewiesen werden. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt, an dem zur Kultur mit 5 mM Nitrat-Ausgangskonzentration zusätzlich 5 mM Nitrat zugegeben wurden. (■) Zellen mit 5 mM Nitrat, (◆) Zellen mit 15 mM Nitrat. (▲) Nitritkonzentration der Kultur mit 15 mM Nitrat.

Aus den Ergebnissen des Wachstums auf Toluol und Benzoat wurden verschiedene Wachstumsparameter errechnet. Dabei wurde die Wachstumsrate μ , die Verdopplungszeit t_D , der molare Ertragskoeffizient Y_m und der metabolische Quotient Q bestimmt (Tab. 48).

Tab. 48: Wachstumsparameter von *G. metallireducens* auf Toluol und Benzoat. Als terminaler Elektronenakzeptor diente 5 mM Nitrat.

Substrat	t_D [h]	μ [h^{-1}]	Y_m [$g_{\text{Protein}} \text{ mol}_{\text{Substrat}}^{-1}$]	Q [$nmol \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$]
Toluol	43	0,016	10,8	26
Benzoat	7	0,100	10,5	160

1.3.2 Untersuchungen zur nativen (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *G. metallireducens*

Die Aktivität der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase wurde in Zellextrakten gemessen. Diese stammte von *G. metallireducens* Zellen, die mit Toluol oder Benzoat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen wurden. Die spezifischen Aktivitäten wurden sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen bestimmt.

Im Zellextrakt von Zellen, die auf Toluol gewachsen waren, wurde eine spezifische Aktivität von $3,1 \pm 0,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (aerober Assay) bzw. $3,6 \pm 0,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (anaerober Assay) festgestellt. Als Kontrolle diente Zellextrakt von Zellen die auf Benzoat angezogen wurden. Hier war weder unter aeroben noch unter anaeroben Bedingungen Enzym-Aktivität festzustellen (Vgl. Tab 49).

Tab. 49: spezifische Aktivität der nativen (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase.

Substrat	aerobe Assay	anaerob Assay
Toluol	$3,1 \pm 0,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$	$3,6 \pm 0,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$
Benzoat	$< 0,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$	$< 0,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$

1.3.3 Überproduktion und Reinigung der rekombinanten (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase von *G. metallireducens*.

Die rekombinante (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase wurde aufgrund der seltenen Codons des Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase-Gens im *E. coli* Stamm Rosetta (DE3)pLysS überproduziert. Dieser

Stamm verfügt unter anderem über ein Plasmid mit der Bezeichnung pRARE, welches die Gene für sieben, seltene tRNAs trägt. Da sich bei der Überproduktion in herkömmlichen LB-Medium mit entsprechender Induktion durch IPTG kaum lösliches Protein produzieren ließ, wurde die Zellen bei niedrigerer Temperatur (18°C) inkubiert und über ein Autoinduktions-Verfahren die Produktion des Proteins induziert (Material und Methoden 3.1). und die Zellen bei niedrigerer Temperatur (18°C) inkubiert. Aufgrund der besonderen Zusammensetzung des Mediums und der niedrigen Temperatur wurde dadurch eine langsame Expression des Proteins gewährleistet, sodass eine wesentlich höhere Menge an löslichem Protein produziert wurde. Zugleich wurde eine sehr hohe Zelldichte erreicht, da es sich um ein gepuffertes Vollmedium mit zusätzlichen Spurenelementen handelt. Durch diese Art der Überexpression wurde die Ausbeute an löslichem und aktivem Protein im Vergleich zur üblichen Methode um ein zehnfaches gesteigert.

Affinitäts-Chromatographie an Nickel-Sepharose. Der Zellextrakt von *E. coli* mit überproduzierter (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase wurde auf eine Nickel-Sepharose-Säule geladen. Anschließend wurde unspezifisch gebundenes Protein mit 20 mM Imidazol im Grundpuffer von der Säule gewaschen. Danach wurde ein weiterer Waschschrift mit 80 mM Imidazol im Grundpuffer vollzogen. Die Elution der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase erfolgte mit 200 mM Imidazol im Grundpuffer, wobei mehrere Fraktionen an Eluat aufgefangen wurden. Fraktionen 3 und 4 wurden anschließend vereinigt und auf Enzymaktivität getestet (Abb. 14). Die spezifische Aktivität der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase lag bei $0,056 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ mit einer 19 fachen Anreicherung und einer Ausbeute von 15% (Tab. 50).

Tab. 50: Reinigungstabelle der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase.

Fraktion	Proteinmasse [mg]	Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1}$]	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	Anreicherung [fach]	Ausbeute [%]
Extrakt	502	1,536	0,003	1	100
IMAC	4	0,224	0,056	19	15

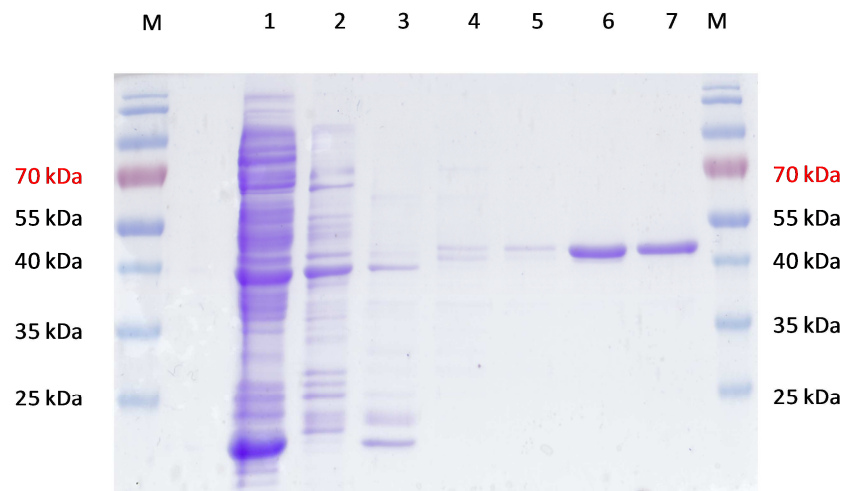


Abb. 14: SDS-Reinigungsgel der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *G. metallireducens*. Zu sehen sind die einzelnen Fraktionen der Reinigung aufgetrennt auf einem 12%igen, mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgel. Die Bande der überproduzierten (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase mit einer Masse von etwa 46 kDa ist als reines Protein in den Fraktionen 6 und 7 zu erkennen. **M:** Massenstandard. **1:** Durchfluss. **2:** Waschschrift mit 20 mM Imidazol. **3:** Waschschrift (50 mM Imidazol). **4:** Waschschrift (80 mM Imidazol). **5:** Fraktion 1 (Elution mit 200 mM Imidazol). **6:** Fraktion 2 (Elution mit 200 mM Imidazol). **7:** Fraktion 3 (Elution mit 200 mM Imidazol).

1.3.4 UV/Vis Spektroskopie der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *G. metallireducens*

Von der gereinigten (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase wurde ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen bei einer Proteinkonzentration von $0,54 \text{ mg ml}^{-1}$, was bei einer errechneten Masse von 46360 Da einer Konzentration von $11,6 \text{ }\mu\text{M}$ (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase entspricht. Ein Maximum des Spektrums liegt bei 265 nm, zwei weitere Maxima bei 370 nm und 448 nm was einem typischen Spektrum eines Flavinkofaktors entspricht (Abb. 15).

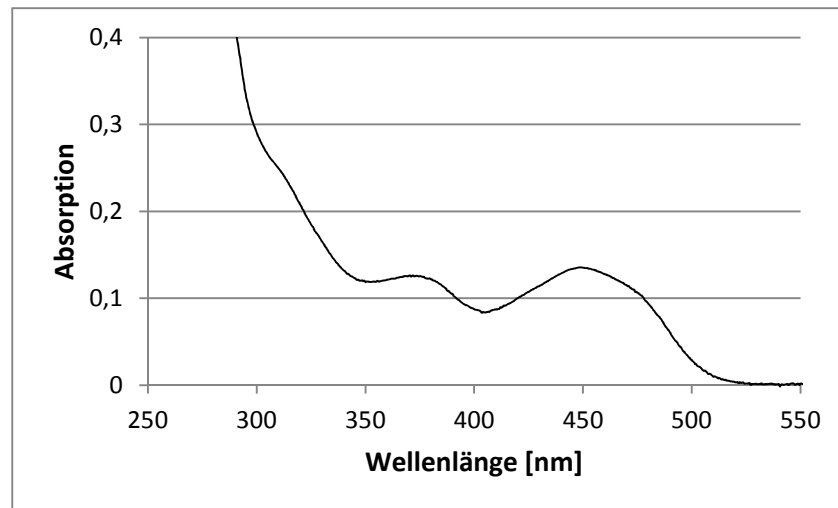


Abb. 15: UV/Vis-Spektrum der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Das Spektrum wurde vom gereinigten Protein mit einer Konzentration von $0,54 \text{ mg ml}^{-1}$ ($11,6 \text{ }\mu\text{M}$ (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase) aufgenommen. Als Proteinpuffer diente 100 mM Tris/HCl pH 7,0 gegen den auch der Nullwert bestimmt wurde.

1.3.5 Photometrische Tests zur Bestimmung der Enzymaktivität der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *G. metallireducens*

Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe photometrischer Tests unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei 30°C bestimmt (Material und Methoden 9.1). Als Elektronenakzeptor diente Ferroceniumhexafluorophosphat und die Reaktion wurde jeweils mit Benzylsuccinyl-CoA als Substrat gestartet. Dabei wurden zunächst pH-Optimum und Temperatur-Optimum bestimmt und im Anschluss daran die maximale Aktivität V_{max} sowie den apparenten K_{m} -Wert mittels Michaelis-Menten-Gleichung ermittelt. Zur Bestimmung der Substratspezifität wurden unterschiedliche Substrate im Aktivitätstest eingesetzt. Außerdem wurde die Aktivität des Enzyms in der Rückreaktion getestet.

Sauerstoffsensibilität der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Zunächst wurde untersucht, ob das Enzym nur unter anaeroben Bedingungen die Oxidation von Benzylsuccinyl-CoA [$100 \text{ }\mu\text{M}$] katalysiert oder ob es auch unter aeroben Bedingungen seine Aktivität behält. Dabei wurden zunächst Aktivitätstests unter anaeroben Bedingungen durchgeführt und das Enzym anschließend dem Sauerstoff der Luft ausgesetzt. Die spezifische Aktivität wurde dann photometrisch zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Die Ergebnisse zeigten zwar einen Aktivitätsverlust des

Enzyms nach Inkubation über längere Zeit (Tab. 51). Dieser war jedoch nicht abhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff.

Tab. 51: Sauerstoffabhängigkeit der spezifischen Aktivität der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase.

Bedingung	spezifische Aktivität	relative spez. Aktivität
anaerob	0,39 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	100%
anaerob (nach 20 Minuten)	0,35 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	90%
aerob (1 Minute an der Luft)	0,36 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	92%
aerob (5 Minuten an der Luft)	0,32 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	82%
aerob (30 Minuten an der Luft)	0,34 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	87%

pH-Abhängigkeit der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Die pH-Abhängigkeit wurde bei 30°C mittels photometrischem Test mit Ferroceniumhexafluorophosphat (FcPF_6) als künstlichem Elektronenakzeptor durchgeführt. Die Proteinkonzentration der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase betrug $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ und die Konzentration des Substrats Benzylsuccinyl-CoA $100 \mu\text{M}$. Als Puffer wurden für den pH-Bereich von pH 8,0 bis pH 7,0 100 mM Tris/HCl und für den pH-Bereich von pH 6,8 bis pH 6,0 100 mM MES/NaOH verwendet. Das ermittelte pH-Optimum lag bei pH 6,4. Im pH Bereich von pH 6,4 bis pH 7,0 war die Aktivität fast konstant und nahm nur um 14% ab. Im sauren pH-Bereich bei pH 6,0 war lediglich noch 44% der maximalen Aktivität vorhanden und im basischen pH-Bereich bei pH 8,0 nur noch 10% (Abb. 16).

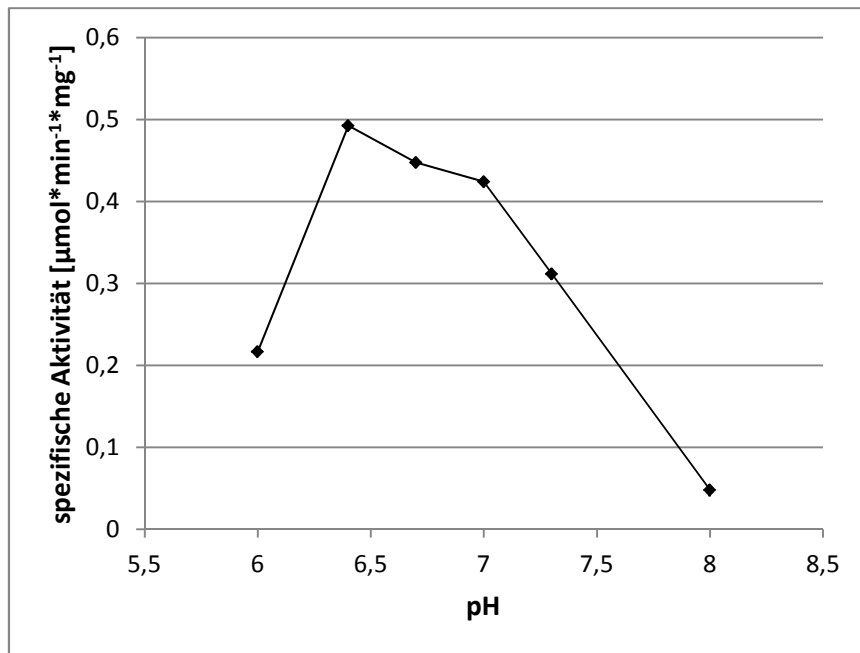


Abb. 16: pH-Abhängigkeit der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase.

Temperaturabhängigkeit der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Die Temperaturabhängigkeit wurde ebenfalls in einem photometrischen Test mit Ferroceniumhexafluorophosphat (FcPF_6) als künstlichem Elektronenakzeptor und $100 \mu\text{M}$ Benzylsuccinyl-CoA. Als Puffer diente 100 mM Tris/HCl pH 7,0 und die Proteinkonzentration der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase betrug $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$. Die Temperaturspanne im Test lag zwischen 20°C und 60°C . Die Aktivität verdoppelte sich in etwa mit einem Anstieg um zehn Grad Celsius und entspricht damit der Arrhenius-Gleichung. Das Temperaturoptimum lag bei 50°C . Bei 60°C wurde nur noch 30% der maximalen Aktivität gemessen (Abb. 17).

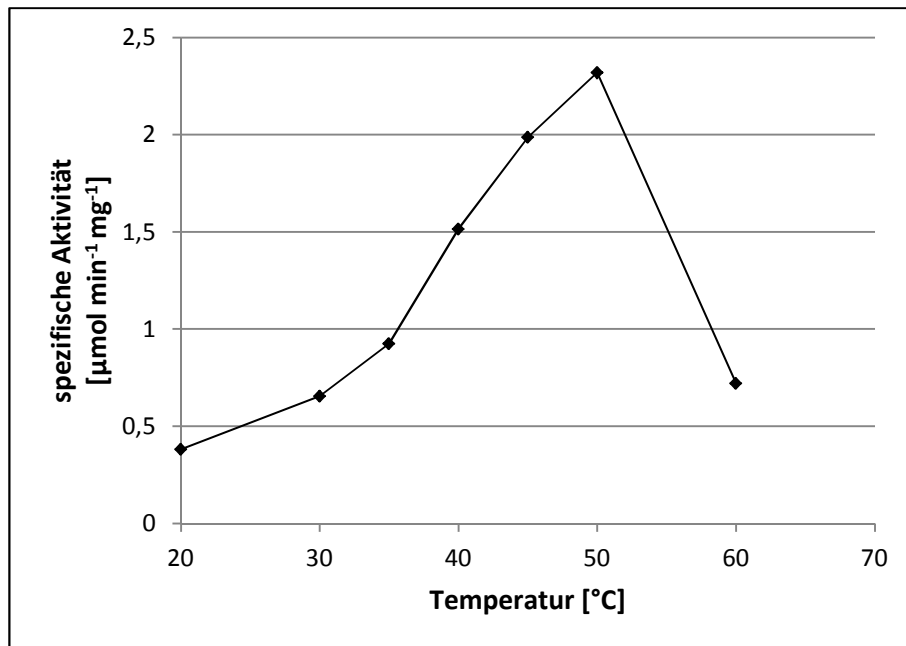


Abb. 17: Temperaturabhängigkeit der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase.

Bestimmung der apparenten V_{\max} - und K_m -Werte der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Die apparenten K_m - und V_{\max} -Werte der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase wurden mittels photometrischem Enzymtest bestimmt. Dabei wurde Benzylsuccinyl-CoA in einer Konzentration von 10 μM bis 300 μM und Ferroceniumhexafluorophosphat bei einer Konzentration von 200 μM eingesetzt. Die Proteinkonzentration der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase betrug 0,5 mg ml^{-1} . Die Messungen und anschließende Auswertung mit dem Graphikprogramm Prism 4.00 (GraphPad Software; La Jolla, Ca, USA) unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 2) ergaben einen apparenten K_m -Wert von $97,9 \pm 14,8 \mu\text{M}$ und einen apparenten V_{\max} -Wert von $0,70 \pm 0,04 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ($R^2: 0,97$) (Abb. 18).

$$v = \frac{V_{\max} * [x]}{K_m + [x]}$$

Gleichung 2: Michaelis-Menten-Gleichung. V_{\max} : maximale Geschwindigkeit, K_m : Michaelis-Menten-Konstante, x : Substratkonzentration.

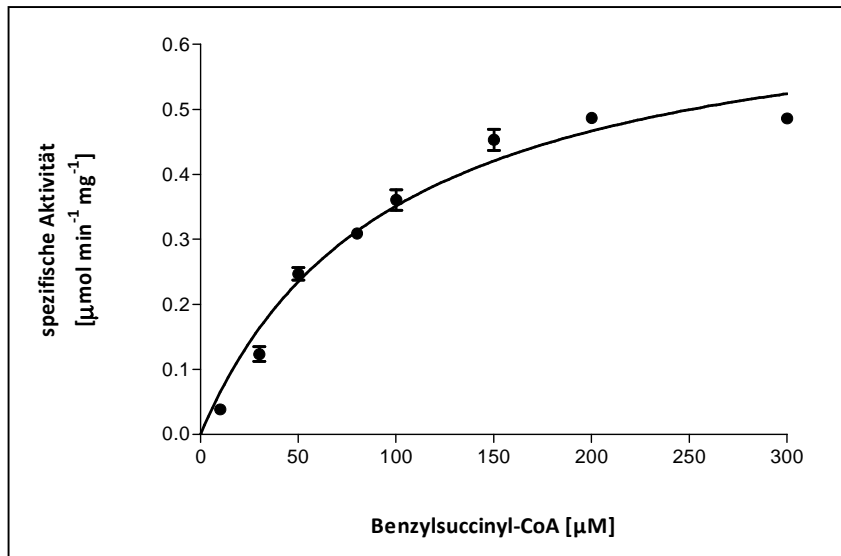


Abb. 18: Enzymkinetik der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Dargestellt sind Mittelwerte von drei voneinander unabhängigen Messungen. Die Ausgleichskurve wurde durch die Verwendung der Datenpunkte in der Michaelis-Menten-Gleichung erstellt.

Substratspezifität der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Im photometrischen Enzymtest wurden unterschiedliche Substrate auf ihre Umsetzung durch die (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase getestet. Dabei wurde einerseits versucht die Oxidation von Substraten mittels Ferroceniumhexafluorophosphat als künstlichem Elektronenakzeptor zu bestimmen (Hinreaktion), andererseits aber auch die Reduktion von Substraten mittels Methylviologen als Elektronendonator unter anaeroben Bedingungen zu messen (Rückreaktion). Die Reaktion wurde jeweils mit Zugabe des Substrats gestartet. Die spezifische Aktivität der Rückreaktion wurde mit $6,47 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bestimmt. Damit ist diese 27-mal höher als die der Hinreaktion. Alle weiteren getesteten Substrate zeigten im Vergleich zum eigentlichen Substrat eine sehr geringe spezifische Aktivität (Vgl. Tab 52).

Tab. 52: Substratspezifität der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase. Die relative spezifische Aktivität gibt das Verhältnis von spezifischer Aktivität des Enzyms mit dem jeweiligen alternativen Substrat zur spezifischer Aktivität des Enzyms mit Benzylsuccinyl-CoA (100% Hinreaktion) oder (*E*)-Phenylitaconyl-CoA (100% Rückreaktion) an.

Substrat (Hinreaktion)	spezifische Aktivität	Relative spez. Aktivität
Benzylsuccinyl-CoA [50 µM]	0,24 µmol min ⁻¹ mg ⁻¹	100%
Butyryl-CoA [100 µM]	0,006 µmol min ⁻¹ mg ⁻¹	3%

Substrat (Rückreaktion)	spezifische Aktivität	Relative spez. Aktivität
(<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA [50 µM]	6,47 µmol min ⁻¹ mg ⁻¹	100%
Crotonyl-CoA [100 µM]	0,074 µmol min ⁻¹ mg ⁻¹	1%
(<i>E</i>)-3-Phenylacryl-CoA [100 µM]	0,025 µmol min ⁻¹ mg ⁻¹	<1%

Kombination mit dem Elektronen-Transferierenden Flavoprotein. Im photometrischen Enzymtest mit 200 µM Ferroceniumhexafluorophosphat als künstlichem Elektronenakzeptor wurde die Aktivität der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase in Kombination mit dem Elektronen-Transferierenden Flavoprotein aus *G. metallireducens* untersucht. Als Substrat dienten 100 µM Benzylsuccinyl-CoA. In Abwesenheit des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins betrug die spezifische Aktivität für die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase $0,26 \pm 0,03$ µmol min⁻¹ mg⁻¹. Zusammen mit dem Elektronen-Transferierenden Flavoprotein war die spezifische Aktivität der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase mit $0,57 \pm 0,05$ µmol min⁻¹ mg⁻¹ mehr als doppelt so hoch (Vgl. Abb. 19). Die Kontrolle nur mit Elektronen-Transferierenden Flavoprotein und ohne (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase zeigte keine Aktivität.

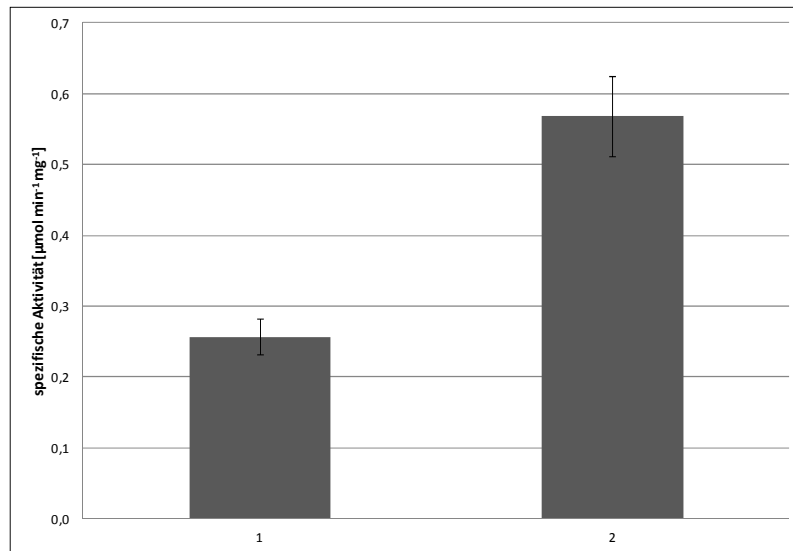


Abb. 19: Kombination der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase mit dem Elektronen-Transferierenden Flavoprotein aus *G. metallireducens*. **1** Ansatz mit 20 µg (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. **2** Ansatz mit 20 µg (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase und 20 µg Elektronen-Transferierendem Flavoprotein.

1.4 Charakterisierung der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *D. toluolica*.

1.4.1 Wachstum von *D. toluolica* auf Toluol und Benzoat.

Um die Enzyme des anaeroben Toluolabbaus zu charakterisieren, wurde *D. toluolica* zwei unterschiedlichen Kohlenstoff- und Energiequellen angezogen. Die Bakterien wuchsen zum einen auf Toluol und zum anderen auf Benzoat, jeweils mit Sulfat als terminalem Elektronenakzeptor. Ziel war es, die nativen Enzyme des anaeroben Toluolabbaus zu charakterisieren, die Zellen auf Benzoat sollten dabei als Negativkontrolle dienen. Beide Kulturen zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten (Vgl. Abb. 20). Innerhalb der ersten zwei Monate erreichte die Kultur auf Toluol eine OD₅₇₈ von 0,026 und die Kultur auf Benzoat eine OD₅₇₈ von 0,029. Im Verlauf von weiteren drei Monaten erreichte die Kultur auf Toluol eine OD₅₇₈ von 0,035 und die Kultur auf Benzoat eine OD₅₇₈ von 0,034. Beide Kulturen hatten zu diesem Zeitpunkt die stationäre Phase erreicht.

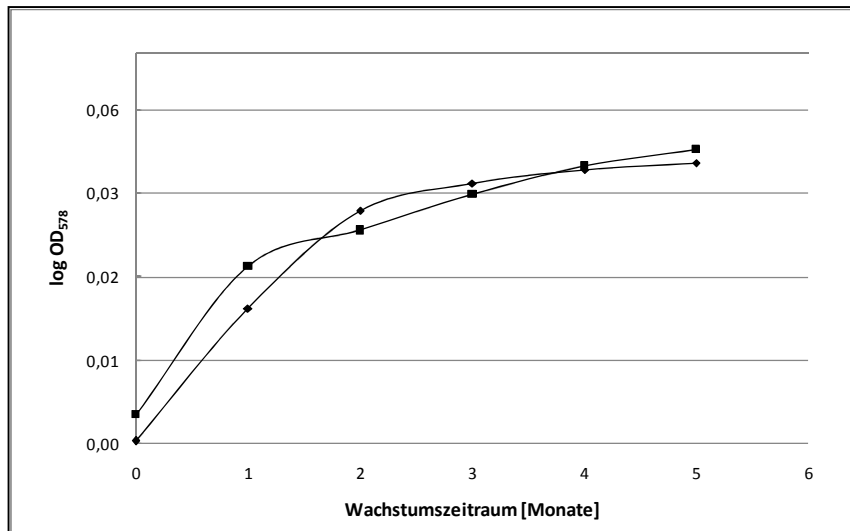


Abb. 20: Wachstumskurve von *D. toluolica* auf Toluol und Benzoat. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurde die Optische Dichte bei 578 nm bestimmt. Die Zellen wuchsen auf jeweils 1 mM Toluol oder Benzoat mit 28 mM Sulfat als Elektronenakzeptor. (■) Zellen auf Toluol. (◆) Zellen auf Benzoat.

Aus den Ergebnissen des Wachstums auf Toluol und Benzoat wurden verschiedene Wachstumsparameter errechnet. Dabei wurde die Wachstumsrate μ , die Verdopplungszeit t_D , der molare Ertragskoeffizient Y_m und der metabolische Quotient Q bestimmt (Tab. 53). Die geernteten Zellen wurden unter anderem für die Sequenzierung der Gene der *bss*- und *bbs*-Operons verwendet. Für enzymatische Versuche wurde leider nicht genug Zellmasse gewonnen.

Tab. 53: Wachstumsparameter von *D. toluolica* auf Toluol und Benzoat. Als terminaler Elektronenakzeptor diente 28 mM Sulfat.

Substrat	t_D [d]	μ [h^{-1}]	Y_m [$g_{\text{Protein}} \text{ mol}_{\text{Substrat}}^{-1}$]	Q [$\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$]
Toluol	75	$3,9 \cdot 10^{-4}$	4,2	1,5
Benzoat	54	$5,3 \cdot 10^{-4}$	3,8	2,3

1.4.2 Überproduktion und Reinigung der rekombinanten (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *D. toluolica*

Ähnlich wie das Gen der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *G. metallireducens* zeigt das Äquivalent aus *D. toluolica* eine Verwendung seltener Codons. Aus diesem Grund wurde das entsprechende Protein ebenfalls in dem *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3)pLysS überproduziert.

Affinitäts-Chromatographie an Strep-Tactin Superflow. Der Zellextrakt von *E. coli* mit überproduzierter (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase wurde auf eine Strep-Tactin-Säule geladen. Nach einem Waschschrift mit drei Säulenvolumen Waschpuffer (Puffer W), um unspezifische Proteine zu entfernen, wurde die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase mittels 2,5 mM Desthiobiotin im Waschpuffer (Puffer E) in unterschiedlichen Fraktionen eluiert. Abbildung 20 zeigt das SDS-Reinigungsgel und der Pfeil markiert die Bande der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Das Protein konnte nicht vollständig gereinigt werden.

Tab. 54: Reinigungstabelle der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase.

Fraktion	Proteinmasse [mg]	Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1}$]	Spez. Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	Anreicherung	Ausbeute %
Extrakt	438	0,763	0,002	1	100
Strep-Tactin Superflow	0,5	0,098	0,196	98	13

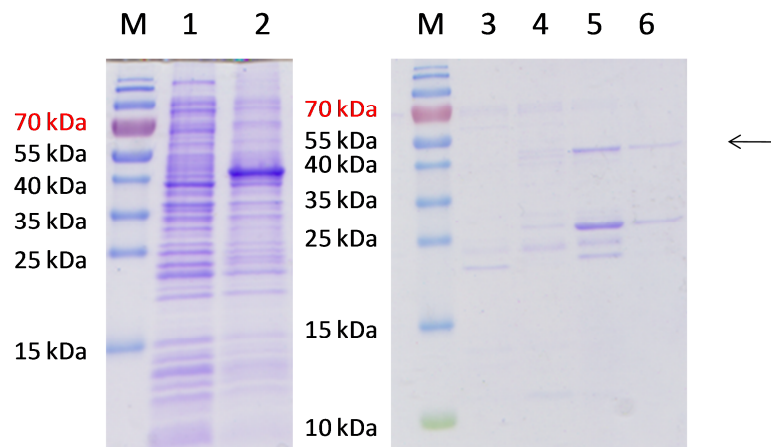


Abb. 20: SDS-Reinigungsgel der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *D. toluolica*. Zu sehen sind die einzelnen Fraktionen der Reinigung aufgetrennt auf einem 12%igen, mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgel. Der Pfeil auf der rechten Seite markiert die Bande der überproduzierten (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase mit einer Masse von etwa 46 kDa. **M:** Massenstandard. **1:** Ganze *E. coli* Zellen vor Induktion. **2:** Ganze *E. coli* Zellen nach Induktion mit 200 μg AHT pro Liter Kultur (432 nM). **3:** Fraktion 1 (Elution mit 2,5 mM Desthiobiotin). **4:** Fraktion 2 (Elution mit 2,5 mM Desthiobiotin). **5:** Fraktion 3 (Elution mit 2,5 mM Desthiobiotin). **6:** Fraktion 4 (Elution mit 2,5 mM Desthiobiotin).

1.4.3 Photometrische Tests zur Bestimmung der Enzymaktivität der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *D. toluolica*.

Die Enzymaktivität wurde wie bereits bei der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase von *G. metallireducens* beschrieben, mittels photometrischem Test unter aeroben Bedingungen bei 30°C bestimmt (Material und Methoden 9.1). Aufgrund der geringen verfügbaren Gesamtmenge an Enzym wurden für dieses Enzym lediglich die apparenten V_{\max} - und K_m -Werte bestimmt, sowie der Vergleich der apparenten spezifischen Aktivität zwischen Hin- und Rückreaktion.

Bestimmung der apparenten V_{\max} - und K_m -Werte der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Für die Bestimmung der apparenten V_{\max} - und K_m -Werte wurde als Substrat Benzylsuccinyl-CoA in Konzentrationen von 10 μM bis 300 μM und Ferroceniumhexafluorophosphat bei einer Konzentration von 200 μM eingesetzt. Die Proteinkonzentration der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase betrug 0,3 mg ml^{-1} . Die Messungen und anschließende Auswertung mit dem Graphikprogramm Prism 4.00 (GraphPad Software; La Jolla, Ca, USA) unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 2) ergaben einen apparenten K_m -Wert von $85,3 \pm 8,2 \mu\text{M}$ und einen apparenten V_{\max} -Wert von $0,39 \pm 0,02 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (R^2 : 0,99) (Abb. 21).

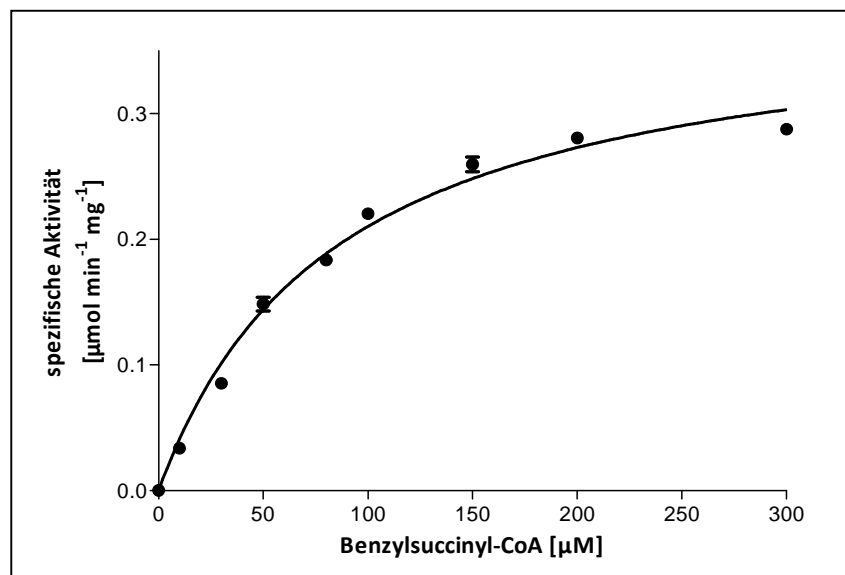


Abb. 21: Enzymkinetik der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Dargestellt sind Mittelwerte von drei voneinander unabhängigen Messungen. Die Ausgleichskurve wurde durch die Verwendung der Datenpunkte in der Michaelis-Menten-Gleichung erstellt.

Rückreaktion der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Neben der erwarteten Oxidation von Benzylsuccinyl-CoA wurde außerdem getestet, ob das Enzym die Reduktion von Phenylitaconyl-CoA mittels künstlichem Elektronendonator katalysieren kann. Die spezifische Aktivität der Rückreaktion war im Vergleich zur Hinreaktion zwanzigmal höher und betrug $3,70 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Der Faktor für die (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase in *G. metallireducens* war 27-mal höher und in *T. aromatica* 49-mal höher.

Tab. 55: Hin- und Rückreaktion der (R)-Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase. Die spezifische Aktivität der Rückreaktion mit Phenylitaconyl-CoA wurde unter anaeroben Bedingungen mit Methylviologen als künstlichem Elektronendonator photometrisch bestimmt. Zum Vergleich wurde ebenfalls die spezifische Geschwindigkeit der Hinreaktion sowohl unter aeroben wie auch anaeroben Bedingungen gemessen.

Substrat	spezifische Aktivität
Benzylsuccinyl-CoA [50 μM]	$0,17 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (aerobe Bedingungen)
Benzylsuccinyl-CoA [50 μM]	$0,19 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (anaerobe Bedingungen)
Phenylitaconyl-CoA [50 μM]	$3,70 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (anaerobe Bedingungen)

1.5 Charakterisierung der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *T. aromatica*.

1.5.1 Überproduktion und Reinigung der rekombinanten (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *T. aromatica*.

Die Überproduktion und Reinigung der rekombinanten (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *T. aromatica* wurde in Anlehnung an das Protokoll von C. Leutwein (Leutwein und Heider 2002) vollzogen. Die Überproduktion wurde in *E. coli* DH5 α durchgeführt und der Ablauf der Reinigung unter Verwendung von drei Chromatographieschritten leicht modifiziert.

Tab. 56: Reinigungstabelle der überproduzierten (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *T. aromatica*.

Fraktion	Proteinmasse [mg]	Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1}$]	spez. Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	Anreicherung	Ausbeute [%]
Zellextrakt	433	49,0	0,11	1	100
DEAE Sepharose	24	24,0	1,0	9	49
Hydroxylapatit	10	13,0	1,3	12	27
Gelfiltration	1,6	3,5	2,2	20	7

Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sepharose Fast Flow. Zellextrakt (10 ml) von *E. coli* mit überproduzierter (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase wurde auf eine DEAE Sepharose-Säule geladen (25 ml) und diese im Anschluss mit zwei Säulenvolumen Grundpuffer gewaschen. Darauf folgte die Elution der gebundenen Proteine über einen linearen Gradienten von 0 – 500 mM NaCl über acht Säulenvolumina. Das Protein eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 225 – 290 mM in einem Volumen von 30 ml. Die spezifische Aktivität der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase lag bei $1,0 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, die Anreicherung war 9-fach und die Ausbeute lag bei 49%.

Hydroxylapatit-Chromatographie. Das Eluat der DEAE Sepharose-Reinigung wurde auf eine Säule mit Hydroxylapatit CHT Typ I Material (15 ml) aufgetragen und anschließend mit fünf Säulenvolumen Grundpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte dann über einen linearen Gradienten von 0 – 50 mM Kaliumphosphat über zwölf Säulenvolumina. Die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase eluierte bei einer Konzentration von 18 – 24 mM Kaliumphosphat in einem Volumen von 25 ml. Die spezifische Aktivität der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase lag bei $1,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, die Anreicherung war 12-fach und die Ausbeute lag bei 27%.

Gelfiltration Superdex 200 prep grade. Ein Aliquot des ankonzentrierten Eluats der Hydroxylapatit-Säule (1 ml) wurde auf eine präparative Gelfiltrationssäule HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Säule geladen. Die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase eluierte nach 71 ml in einem Volumen von 8 ml. Die spezifische Aktivität betrug $2,2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, die Anreicherung war 20-fach und die Ausbeute lag bei 7%.

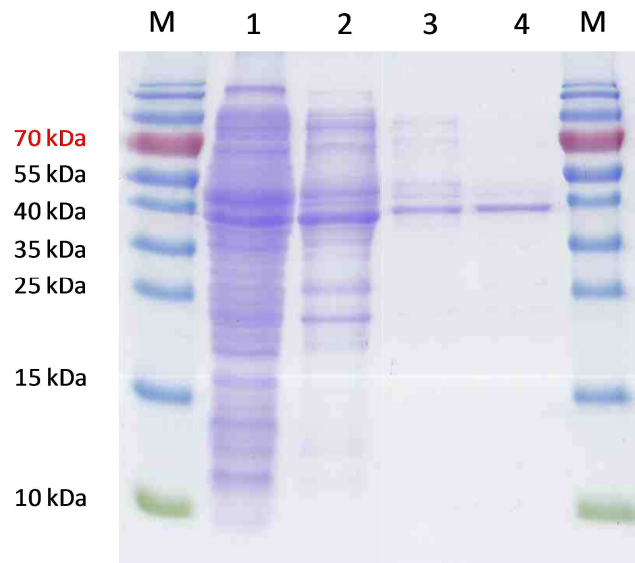


Abb. 22: SDS-Reinigungsgel der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *T. aromatica*. Zu sehen sind die einzelnen Fraktionen der Reinigung aufgetrennt auf einem 12%igen, mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgel. **M:** Massenstandard. **1:** Zellextrakt von *E. coli* mit überproduzierter (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. **2:** DEAE-Sepharose-Fraktion. **3:** Hydroxylapatit-Fraktion. **4:** Gelfiltrations-Fraktion.

1.5.2 UV/Vis Spektroskopie der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *T. aromatica*.

Von der gereinigten (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase wurde ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen bei einer Proteinkonzentration von $0,45 \text{ mg ml}^{-1}$, was bei einer errechneten Masse von 45583 Da einer Konzentration von $9,9 \text{ } \mu\text{M}$ (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase entspricht. Ein Maximum des Spektrums liegt bei 265 nm, zwei weitere Maxima bei 370 nm und 440 nm was einem typischen Spektrum eines Flavinkofaktors entspricht (Abb. 23).

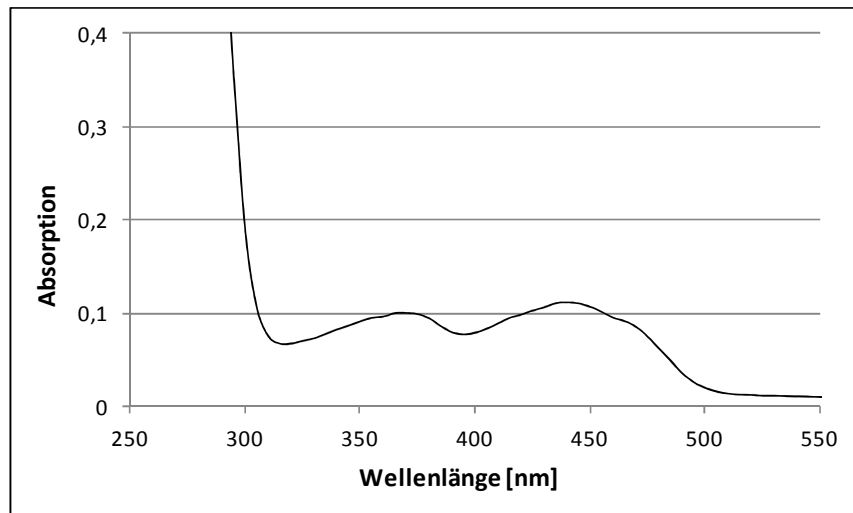


Abb. 23: UV/Vis-Spektrum der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Das Spektrum wurde vom gereinigten Protein mit einer Konzentration von $0,45 \text{ mg ml}^{-1}$ ($9,9 \text{ }\mu\text{M}$ (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase) aufgenommen. Als Proteinpuffer diente 100 mM Tris/HCl pH 7,0 gegen den auch der Nullwert bestimmt wurde.

1.5.3 Photometrische Tests zur Bestimmung der Enzymaktivität der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *T. aromatica*.

Die Enzymaktivität wurde wie bereits bei den anderen (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenasen beschrieben mittels photometrischer Tests unter aeroben Bedingungen bei 30°C bestimmt (Material und Methoden 9.1). Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde rekombinantes Enzym nach dem zweiten Chromatographieschritt verwendet ($0,8 \text{ mg ml}^{-1}$, Ergebnisse 1.5.1).

Bestimmung des apparenten V_{max} - und K_{m} -Werte der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Für die Bestimmung der apparenten V_{max} - und K_{m} -Werte wurde Benzylsuccinyl-CoA in Konzentrationen von $10 \text{ }\mu\text{M}$ bis $300 \text{ }\mu\text{M}$ und Ferroceniumhexafluorophosphat bei einer Konzentration von $200 \text{ }\mu\text{M}$ eingesetzt. Die Proteinkonzentration der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase betrug $0,8 \text{ mg ml}^{-1}$. Die Messungen und anschließende Auswertung mit dem Graphikprogramm Prism 4.00 (GraphPad Software; La Jolla, Ca, USA) unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 2) ergaben einen apparenten K_{m} -Wert von $139,7 \pm 27,9 \text{ }\mu\text{M}$ und einen apparenten V_{max} -Wert von $0,73 \pm 0,06 \text{ }\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ($R^2: 0,97$) (Abb. 24). Der apparente V_{max} -Wert lag etwa 10-fach niedriger als die zuvor bestimmte spezifische Aktivität des reinen Enzyms ($6,4 \text{ }\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) von C.

Leutwein, der apparente K_m -Wert entspricht nahezu dem bestimmten Wert ($110 \pm 10 \mu\text{M}$) des reinen Enzyms (Leutwein und Heider, 2002).

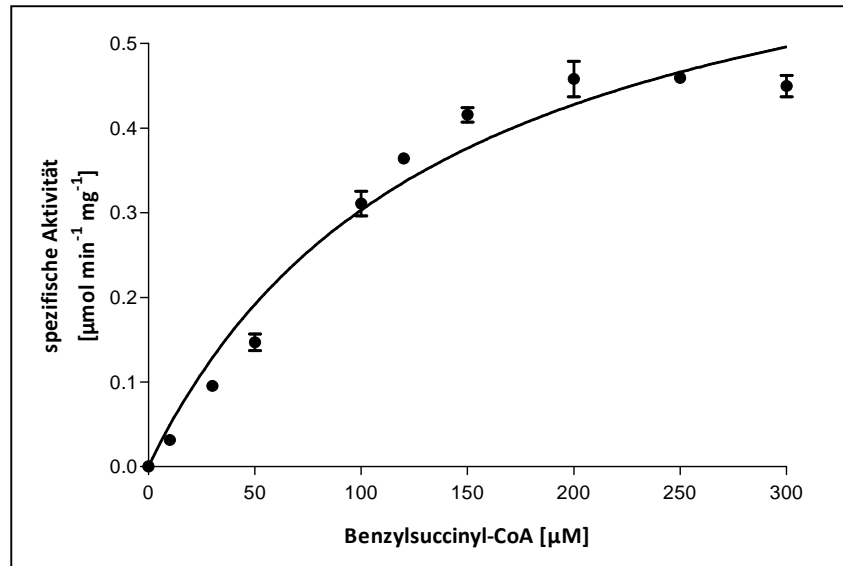


Abb. 24: Enzymkinetik der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Dargestellt sind Mittelwerte von drei voneinander unabhängigen Messungen. Die Ausgleichsgerade wurde durch die Verwendung der Datenpunkte in der Michaelis-Menten-Gleichung erstellt.

Reversibilität der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Mittels photometrischen Enzymtests wurden unterschiedliche Substrate auf ihre Umsetzung durch die (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase getestet. Dabei wurde einerseits versucht, die Oxidation von Substraten mittels Ferroceniumhexafluorophosphat als künstlichem Elektronenakzeptor zu bestimmen (Hinreaktion) und andererseits die Reduktion von Substraten mittels Methylviologen als Elektronendonator unter anaeroben Bedingungen zu messen (Rückreaktion). Die Reaktion wurde jeweils mit Zugabe des Substrats gestartet. Die spezifische Aktivität der Rückreaktion wurde mit $68,1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bestimmt (Vgl. Tab 57). Damit ist diese 49-mal höher als die der Hinreaktion. Alle weiteren getesteten Substrate zeigten im Vergleich zum eigentlichen Substrat eine sehr geringe spezifische Aktivität (Vgl. Tab 58). Die Ergebnisse von C. Leutwein konnten bestätigt werden (Vgl. Leutwein und Heider, 2002). In beiden Fällen konnte keine Oxidation von Butyryl-CoA durch das Enzym beobachtet werden.

Tab. 57: Hin- und Rückreaktion der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Die spezifische Aktivität der Rückreaktion mit Phenylitaconyl-CoA wurde unter anaeroben Bedingungen mit Methylviologen als künstlichem Elektronendonator photometrisch bestimmt. Zum Vergleich wurde ebenfalls die spezifische Geschwindigkeit der Hinreaktion sowohl unter aeroben wie auch anaeroben Bedingungen gemessen.

Substrat	spezifische Aktivität
Benzylsuccinyl-CoA [50 µM]	1,3 µmol min ⁻¹ mg ⁻¹ (aerobe Bedingungen)
Benzylsuccinyl-CoA [50 µM]	1,4 µmol min ⁻¹ mg ⁻¹ (anaerobe Bedingungen)
Phenylitaconyl-CoA [50 µM]	68,1 µmol min ⁻¹ mg ⁻¹ (anaeroben Bedingungen)

Tab. 58: Substratspezifität der Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase. Die relative spezifische Aktivität gibt das Verhältnis von spezifischer Aktivität des Enzyms mit alternativem Substrat zu spezifischer Aktivität des Enzyms mit eigentlichem Substrat an.

Substrat (Hinreaktion)	spezifische Aktivität	Relative spezifische Aktivität
Benzylsuccinyl-CoA [50 µM]	1,22 µmol min ⁻¹ mg ⁻¹	100%
Butyryl-CoA [100 µM]	0,01 µmol min ⁻¹ mg ⁻¹	<1%

Substrat (Rückreaktion)	spezifische Aktivität	Relative spezifische Aktivität
Phenylitaconyl-CoA [50 µM]	61,11 µmol min ⁻¹ mg ⁻¹	100%
Crotonyl-CoA [100 µM]	0,09 µmol min ⁻¹ mg ⁻¹	<1%
trans-3-Phenylacryl-CoA [100 µM]	0,04 µmol min ⁻¹ mg ⁻¹	<1%

1.6 Charakterisierung des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens*.

1.6.1 Überproduktion und Reinigung des rekombinanten Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens*.

Ähnlich wie bei der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *G. metallireducens* zeigt auch das Gen des Elektronen-Transferierenden Flavoprotein eine Verwendung seltener Codons und wurde aus diesem Grund im *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3)pLysS überproduziert. Zwar zeigten sich bei der

Überproduktion des Proteins in herkömmlichen LB-Medium mit entsprechender Induktion durch IPTG adäquate Mengen an löslichem und aktivem Enzym, diese konnten jedoch durch die Verwendung von Autoinduktionsmedium (Material und Methoden 3.1) und einer Inkubation der Zellen bei niedrigerer Temperatur (18°C) um 150% noch weiter gesteigert werden. Das Heterodimer wurde mit Hilfe von Affinitätschromatographie gereinigt (Vgl. Tab. 59 und Abb. 25). In der Regel lag die Ausbeute an löslichem und aktivem Protein bei etwa 50 mg Protein pro 20 g Feuchtzellen.

Anhand der Primärstruktur wurde die Masse des Proteins berechnet (Swiss Institute of Bioinformatics, ExPASy ProtParam tool). Diese beträgt für die α -Untereinheit 30782,3 Da und für die β -Untereinheit mit N-terminalem His-Tag 29775,2 Da. Zusammen ergibt sich für das Heterodimer eine Masse von 60557,5 Da.

Tab. 59: Reinigungstabelle des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins.

Fraktion	Proteinmasse [mg]	Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1}$]	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	Anreicherung [fach]	Ausbeute [%]
Extrakt	422	0,611	0,001	1	100
IMAC	11	0,041	0,004	4	7

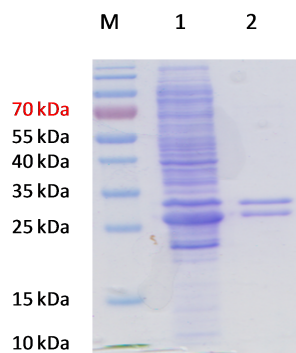


Abb. 25: SDS-Reinigungsgel des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens*.

Zu sehen sind die einzelnen Fraktionen der Reinigung aufgetrennt auf einem 12%igen, mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgel. Die große Untereinheit des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins Etf α ist mit einer Masse 30,8 kDa zu erkennen und die kleine Untereinheit Etf β samt His-Tag mit einer Masse von 29,8 kDa (Etf β 27,3 kDa, His-Tag 2,5 kDa). **M:** Massenstandard. **1:** Zellextrakt von *E. coli* mit überproduziertem Elektronen-Transferierendem Flavoprotein. **2:** Gereinigtes Elektronen-Transferierendes Flavoprotein nach IMAC Sepharose und Gelfiltrationschromatographie.

1.6.2 Untersuchungen zum Kofaktor des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens*

UV/Vis-Spektroskopie. Von dem gereinigten Elektronen-Transferierenden Flavoprotein wurde ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen bei einer Proteinkonzentration von $0,8 \text{ mg ml}^{-1}$, was bei einer errechneten Masse des Heterodimers von 60558 Da einer Konzentration von $13,2 \text{ }\mu\text{M}$ Elektronen-Transferierendes Flavoprotein entspricht. Ein Maximum des Spektrums liegt bei 265 nm und zwei weitere Maxima bei 387 nm und 444 nm. Das Spektrum entspricht mit den charakteristischen Maxima dem eines typischen Flavin-Spektrums (Abb. 26).

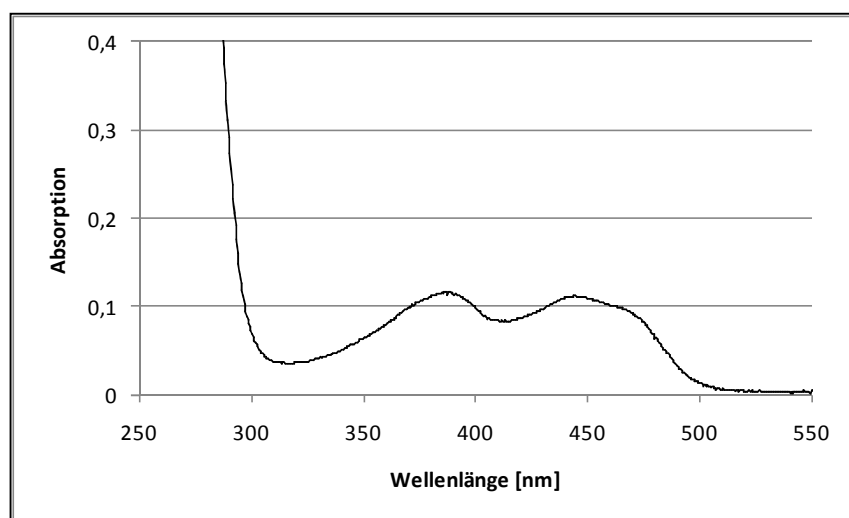


Abb. 26: UV/Vis-Spektrum des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins. Das Spektrum wurde vom gereinigten Protein mit einer Konzentration von $0,8 \text{ mg ml}^{-1}$ ($13,2 \text{ }\mu\text{M}$ Elektronen-Transferierendes Flavoprotein) aufgenommen. Als Proteinpuffer diente 100 mM Tris/HCl pH 7,8 gegen den auch der Nullwert bestimmt wurde.

Charakterisierung des Flavin-Kofaktors des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins. Um zu bestimmen ob es sich bei dem Kofaktor um Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN) oder Riboflavin handelt (Abb. 27), wurde zunächst 1 mg Elektronen-Transferierendes Flavoprotein mittels Hitzeschock bei 95°C denaturiert und anschließend zentrifugiert. Der gelbe Überstand wurde dann zusammen mit Standardlösungen ($200 \text{ }\mu\text{M}$) von FAD, FMN und Riboflavin mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Die einzelnen Stoffe auf der Kieselgelplatte wurden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und ihr Laufverhalten verglichen (Abb. 28). Dabei ist deutlich zu erkennen, dass FAD und der extrahierte Kofaktor der Probe ein ähnliches Laufverhalten zeigen. Im

Gegensatz zu FMN und Riboflavin sind die beiden Proben wesentlich weiter gelaufen, was darauf schließen lässt, dass es sich bei der Probe um FAD handelt.

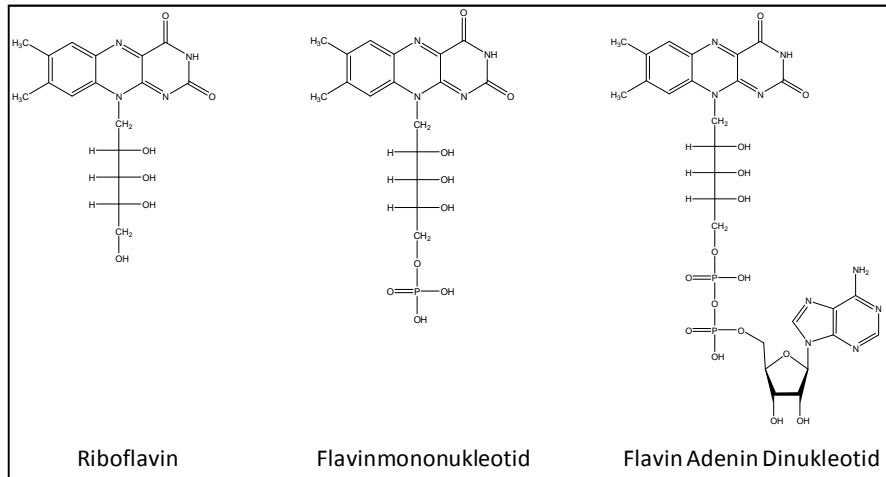


Abb. 27: Unterschiedliche Flavin-Moleküle.

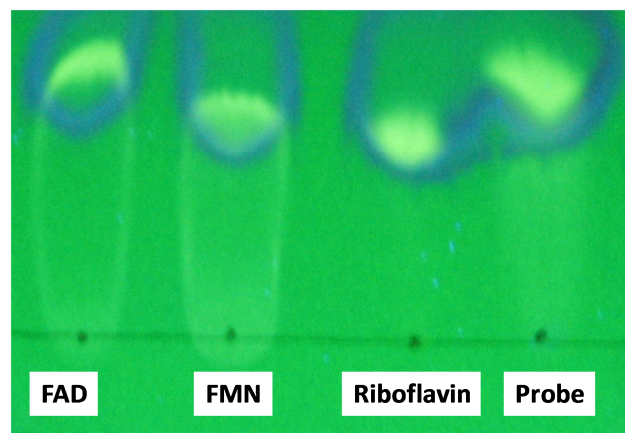


Abb. 28: Kofaktorcharakterisierung mittels Dünnschichtchromatographie. Die einzelnen hellen, blauumrandeten Bereiche zeigen die, durch das Laufmittel transportierten Flavine auf der Kieselgelplatte.

Rekonstitution des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins mit Flavin-Adenin-Dinukleotid. Um zu gewährleisten, dass das Protein nahezu vollständig als Holoenzym vorliegt, wurden 5 mg des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins (82,6 nmol) in 1 ml Lösung aus 1 mM FAD und 1 mM AMP für 12 Stunden auf Eis inkubiert. Abschließend wurde überschüssiges FAD und AMP mittels

Größenausschlusschromatographie entfernt. Zum Vergleich wurde das Verhältnis von FAD zu Heterodimer vor und nach dem Rekonstitutionsexperiment bestimmt (Tab. 60). Dabei wurde die Extinktion des Überstandes von 1 mg denaturiertem Protein bei 450 nm gemessen. Mit dem gemessenen Wert und dem entsprechenden Extinktionskoeffizienten von FAD $\epsilon_{450} = 11,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (De Jong et al., 1992) wurde mittels Lambert-Beerschem Gesetz (Gleichung 3) die Konzentration berechnet. Die Ergebnisse zeigen, dass das Verhältnis von FAD pro Heterodimer durch die Rekonstitution deutlich von 0,68 auf 0,98 FAD pro Heterodimer gesteigert wurden. Die Berechnung der Stöchiometrie zeigte, dass im voll rekonstituierten Zustand ein Elektronen-Transferierendes Flavoprotein ein Molekül FAD bindet (Vgl. Tab. 60).

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} * c * d$$

Gleichung 3. Lambert-Beersches Gesetz. E: Extinktion bei der Wellenlänge λ , ϵ : dekadischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ , c: Konzentration, d: Schichtdicke der Küvette

Tab. 60: Verhältnis von FAD zu Elektronen-Transferierendem Flavoprotein.

Zustand des Enzyms	Menge an Enzym	Menge an FAD	FAD pro Heterodimer
Vor Rekonstitution	15,5 nmol	10,6 nmol	0,68
Nach Rekonstitution	15,1 nmol	14,8 nmol	0,98

Bestimmung der FAD-Konzentration mittels Fluoreszenzspektroskopie. Zusätzlich wurde das Verhältnis von FAD zu Elektronen-Transferierendem Flavoprotein mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmt. Dafür wurde ebenfalls der Überstand von denaturiertem Enzym verwendet, welches zuvor rekonstituiert wurde. Als Standard diente FAD in unterschiedlichen Konzentration, von denen jeweils die entsprechende Emission gemessen wurde (Abb. 29). Die Emission des Protein-Überstandes wurde dann für drei unterschiedliche Verdünnungsstufen bei einem Volumen von 1 ml bestimmt und mit Hilfe der Standardwerte die Konzentration an FAD in der Probe berechnet.

Die Messungen bestätigen, dass ein Molekül Elektronen-Transferierendes Flavoprotein ein Molekül FAD bindet (Tab. 61). Bei zu hohen Konzentrationen an FAD lagen die Werte nicht mehr in einem linearen Bereich. Dementsprechend wurden nur bei ausreichender Verdünnung des Überstands ein exaktes Verhältnis von FAD zu Protein mit einem Wert nahe an 1 gemessen.

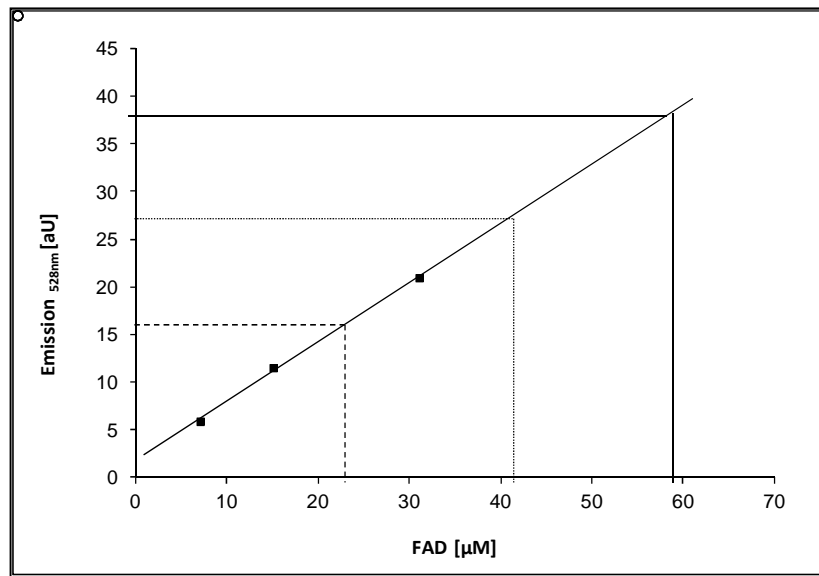


Abb. 29: Standardkurve der Fluoreszenzspektroskopie von FAD. Die unterschiedlichen Konzentrationen an FAD wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm angeregt und die Emission bei 528 nm gemessen. Die Geradengleichung lautet $y = 0,623x + 1,83$ und hat ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,996$. (—) Probe unverdünnt; (.....) Probe 1:2 verdünnt; (- - - -) Probe 1:4 verdünnt.

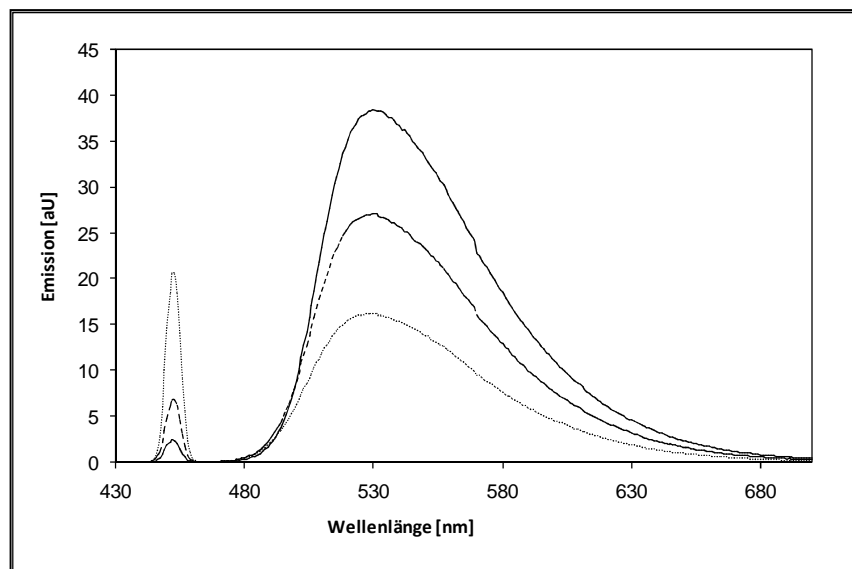


Abb. 30: Emissionsspektrum des Flavin-Adenin-Dinukleotid-Kofaktors. Zu sehen sind die Emissionsspektren dreier unterschiedlicher Konzentrationen des Überstandes von denaturiertem Elektronen-Transferierenden Flavoprotein. Die Emissions-Maxima der einzelnen Proben liegen bei 528 nm. (—) Überstand von 99,1 nmol Protein, (- - -) Überstand 1:2 verdünnt, (.....) Überstand 1:4 verdünnt.

Tab. 61: Verhältnis von FAD zu Elektronen-Transferierendem Flavoprotein. Für die Berechnung der Konzentration an FAD im Überstand wurde die Geradengleichung aus Abbildung 29 verwendet. Die angegebenen Konzentrationen an FAD sind bereits mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

Probe	Emission $_{528\text{ nm}}$	Konzentration FAD	Verhältnis FAD/Protein
unverdünnt	38,3 aU	58,5 μM	0,59
Verdünnung 1:2	27,0 aU	80,8 μM	0,81
Verdünnung 1:4	16,2 aU	92,3 μM	0,92

Rekonstitution mit Flavin Adenin Dinukleotid und Flavinmononukleotid. Um zu untersuchen, ob FMN ebenfalls als Kofaktor für das Elektronen-Transferierende Flavoprotein dient, wurde der eigentliche Kofaktor mittels Behandlung mit 2 M Kaliumbromid entfernt (Vgl. Material und Methoden 7.5.2). Die Masse des farblosen Apoenzyms wurde mittels Größenausschlusschromatographie bestimmt und anschließend auf Aktivität getestet. Im Gegensatz zum Holoenzym zeigte das Elektronen-Transferierende Flavoprotein ohne Kofaktor keine Aktivität. Anschließend wurde ein Teil des Apoenzyms mit FAD, der andere Teil mit FMN inkubiert und danach überschüssiges Flavin durch eine Entsalzungssäule entfernt. Im Aktivitätstest wurde anschließend nur bei mit FAD rekonstituiertem Enzym Aktivität festgestellt. Diese entsprach 21% der spezifischen Aktivität des frisch gereinigten Enzyms.

Tab. 62: Rekonstitution mit FAD und FMN und die entsprechende Aktivität. Die relative spezifische Aktivität gibt die spezifische Aktivität im Vergleich zu der des frisch gereinigten Holoenzym an.

Bedingung des Enzyms	spezifische Aktivität	relative spez. Aktivität
Holoenzym nach Reinigung	0,014 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	100%
Apoenzym	<0,001 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	<1%
Apoenzym mit FMN rekonstituiert	<0,001 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	<1%
Apoenzym mit FAD rekonstituiert	0,003 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	21%

1.6.3 Photometrische Tests zur Bestimmung der Enzymaktivität des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens*

Als artifizielle Enzymaktivität des Proteins wurde die Oxidation von NADH mit Iodnitrotetrazoliumchlorid als Elektronenakzeptor mit Hilfe photometrischer Tests unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei 30°C bestimmt (Material und Methoden 9.2).

Bestimmung des apparenten V_{\max} - und K_m -Werts des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins.

Für die Bestimmung der apparenten V_{\max} - und K_m -Werte für NADH und Iodnitrotetrazoliumchlorid wurde NADH in Konzentrationen von 50 μM bis 2 mM und Iodnitrotetrazoliumchlorid bei einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Die Proteinkonzentration des Enzyms betrug 2,0 mg ml^{-1} . Die Messungen und anschließende Auswertung mit dem Graphikprogramm Prism 4.00 (GraphPad Software; La Jolla, Ca, USA) unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 2) ergaben einen apparenten K_m -Wert von $279,0 \pm 38,3 \mu\text{M}$ und einen apparenten V_{\max} -Wert von $0,022 \pm 0,001 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ($R^2: 0,96$) (Abb. 31).

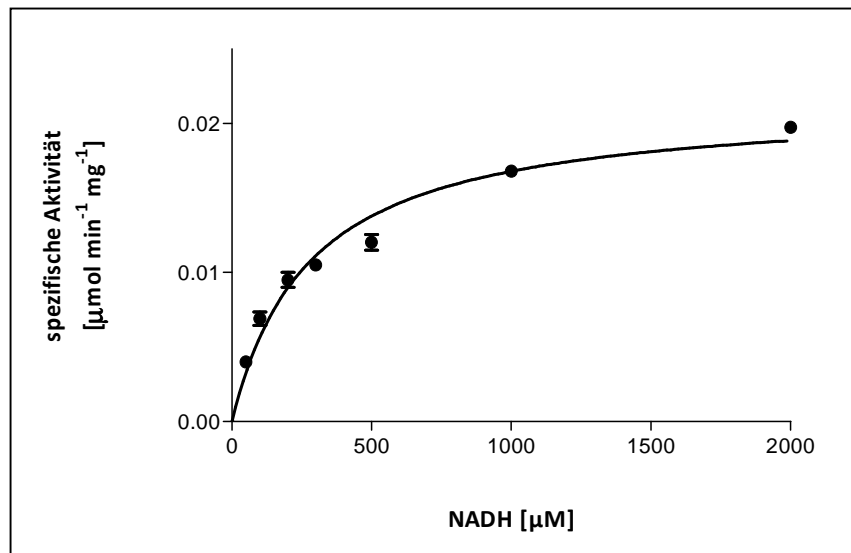


Abb. 31: Enzymkinetik des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins. Dargestellt sind Mittelwerte von drei voneinander unabhängigen Messungen. Die Ausgleichsgerade wurde durch die Verwendung der Datenpunkte in der Michaelis-Menten-Gleichung erstellt.

1.7 Charakterisierung des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *D. toluolica*.

1.7.1 Überproduktion und Reinigung des rekombinanten Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *D. toluolica*.

Die Überproduktion des rekombinanten Elektronen-Transferierenden Flavoproteins fand aufgrund der seltenen Codons in den Genen *etfB* und *etfA* ebenfalls in dem *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3)pLysS unter den gleichen Bedingungen wie beim Elektronen-Transferierenden Flavoprotein aus *G. metallireducens* statt. Das Protein konnte löslich und in aktiver Form gereinigt werden (Vgl. Tab. 63 und Abb. 32).

Anhand der Primärstruktur wurde die Masse des Proteins berechnet (Swiss Institute of Bioinformatics, ExPASy ProtParam tool). Diese beträgt für die α -Untereinheit mit C-terminalem Strep-Tag II 32393,0 Da und für die β -Untereinheit 27359,4 Da. Zusammen ergibt sich für das Heterodimer eine Masse von 59752,4 Da.

Tab. 63: Reinigungstabelle des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins.

Fraktion	Proteinmasse [mg]	Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1}$]	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	Anreicherung [fach]	Ausbeute [%]
Extrakt	355	0,331	0,001	1	100
Strep-Tactin Superflow	2	0,024	0,012	12	7

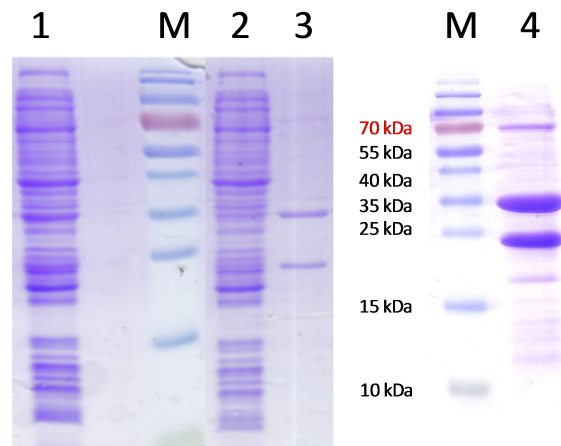


Abb. 32: SDS-Reinigungsgel des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *D. toluolica*. Zu sehen sind die einzelnen Fraktionen der Reinigung aufgetrennt auf einem 12%igen, mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgel. Die große Untereinheit des Elektronen-Transferierenden Flavoprotein Etf α samt Strep-Tag II ist mit einer Masse 32,4 kDa zu erkennen und die kleine Untereinheit Etf β mit einer Masse von 27,4 kDa. **M:** Massenstandard. **1:** Zellextrakt von *E. coli* mit überproduziertem Elektronen-Transferierenden Flavoprotein. **2:** Durchfluss nach laden auf die Strep-Tactin Säule. **3:** Eluat der Strep-Tactin Säule. **4:** Ankonzentriertes Elektronen-Transferierenden Flavoprotein.

1.7.2 Untersuchungen zum Kofaktor des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *D. toluolica*.

UV/Vis-Spektroskopie. Von dem gereinigten Elektronen-Transferierenden Flavoprotein wurde ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen bei einer Proteinkonzentration von $0,6 \text{ mg ml}^{-1}$, was bei einer errechneten Masse des Heterodimers von 59752 Da einer Konzentration von $10,0 \mu\text{M}$ Elektronen-Transferierenden Flavoprotein entspricht. Ein Maximum des Spektrums liegt bei 265 nm und zwei weitere Maxima bei 387 nm und 444 nm. Das Spektrum entspricht mit den charakteristischen Maxima dem eines typischen Flavin-Spektrums.

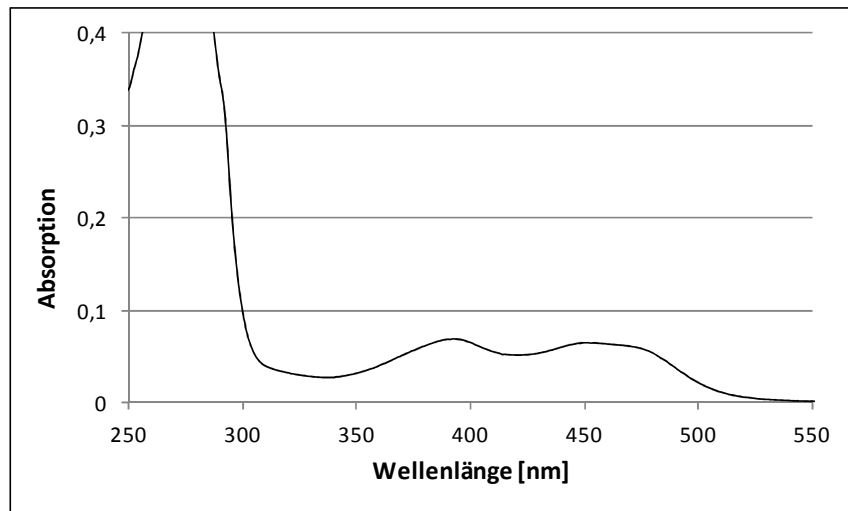


Abb. 33: UV/Vis-Spektrum des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins. Das Spektrum wurde vom gereinigten Protein mit einer Konzentration von $0,6 \text{ mg ml}^{-1}$ ($10,0 \text{ }\mu\text{M}$ Elektronen-Transferierendes Flavoprotein) aufgenommen. Als Proteinpuffer diente 100 mM Tris/HCl pH 7,8 gegen den auch der Nullwert bestimmt wurde.

1.7.3 Photometrische Tests zur Bestimmung der Enzymaktivität des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *D. toluolica*.

Als artifizielle Enzymaktivität des Proteins wurde die Oxidation von NADH mit Iodnitrotetrazoliumchlorid als Elektronenakzeptor mit Hilfe photometrischer Tests unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei 30°C bestimmt (Material und Methoden 9.2).

Bestimmung des apparenten V_{max} - und K_{m} -Werts des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins.

Für die Bestimmung des apparenten V_{max} - und K_{m} -Werts wurde NADH in Konzentrationen von $50 \text{ }\mu\text{M}$ bis 1 mM und Iodnitrotetrazoliumchlorid bei einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Die Proteinkonzentration des Enzyms betrug $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$. Die Messungen und anschließende Auswertung mit dem Graphikprogramm Prism 4.00 (GraphPad Software; La Jolla, Ca, USA) unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 2) ergaben einen apparenten K_{m} -Wert von $37,4 \pm 3,7 \text{ }\mu\text{M}$ und einen apparenten V_{max} -Wert von $0,0074 \pm 0,0002 \text{ }\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ($R^2: 0,99$) (Abb. 34).

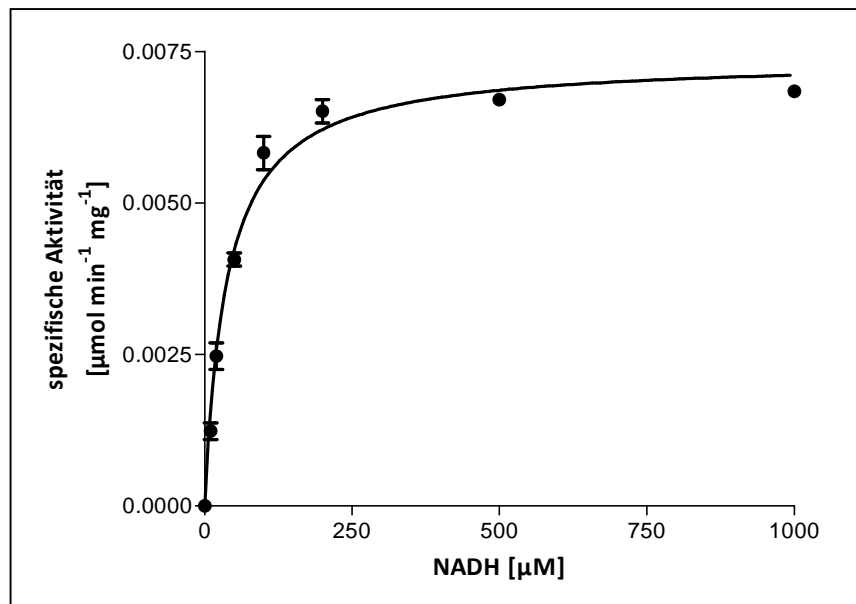


Abb. 34: Enzymkinetik des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins. Dargestellt sind Mittelwerte von drei voneinander unabhängigen Messungen. Die Ausgleichsgerade wurde durch die Verwendung der Datenpunkte in der Michaelis-Menten-Gleichung erstellt.

1.8 Charakterisierung des rekombinanten Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1.

1.8.1 Überproduktion und Reinigung des rekombinanten Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *A. aromaticum*

Die Überproduktion des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins fand in dem *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3)pLysS statt. Das Protein konnte löslich und in aktiver Form gereinigt werden (Vgl. Tab. 64 und Abb. 35).

Anhand der Primärstruktur wurde die Masse des Proteins berechnet (Swiss Institute of Bioinformatics, ExPASy ProtParam tool). Diese beträgt für die α -Untereinheit 31959,3 Da und für die β -Untereinheit mit N-terminalem His-Tag 28975,7 Da. Zusammen ergibt sich für das Heterodimer eine Masse von 60917,0 Da.

Tab. 64: Reinigungstabelle des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins.

Fraktion	Proteinmasse [mg]	Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1}$]	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	Anreicherung [fach]	Ausbeute [%]
Extrakt	430	0,773	0,002	1	100
IMAC	4	0,046	0,012	6	6

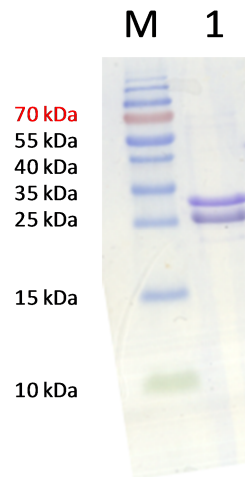


Abb. 35: SDS-Reinigungsgel des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *A. aromaticum*. Zu sehen sind die einzelnen Fraktionen der Reinigung aufgetrennt auf einem 12%igen, mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgel. Die große Untereinheit des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins Etf α ist mit einer Masse 32,0 kDa zu erkennen und die kleine Untereinheit Etf β samt His-Tag mit einer Masse von 29,0 kDa. **M:** Massenstandard. **1:** Gereinigtes Elektronen-Transferierendes Flavoprotein

1.8.2 Untersuchungen zum Kofaktor des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *A. aromaticum*.

UV/Vis-Spektroskopie. Von dem gereinigten Elektronen-Transferierenden Flavoprotein wurde ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen bei einer Proteinkonzentration von $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$, was bei einer errechneten Masse des Heterodimers von 60917 Da einer Konzentration von $16,5 \mu\text{M}$ Elektronen-Transferierenden Flavoprotein entspricht. Ein Maximum des Spektrums liegt bei 265 nm und zwei weitere Maxima bei 387 nm und 444 nm. Das Spektrum entspricht mit den charakteristischen Maxima dem eines typischen Flavin-Spektrums (Abb. 36).

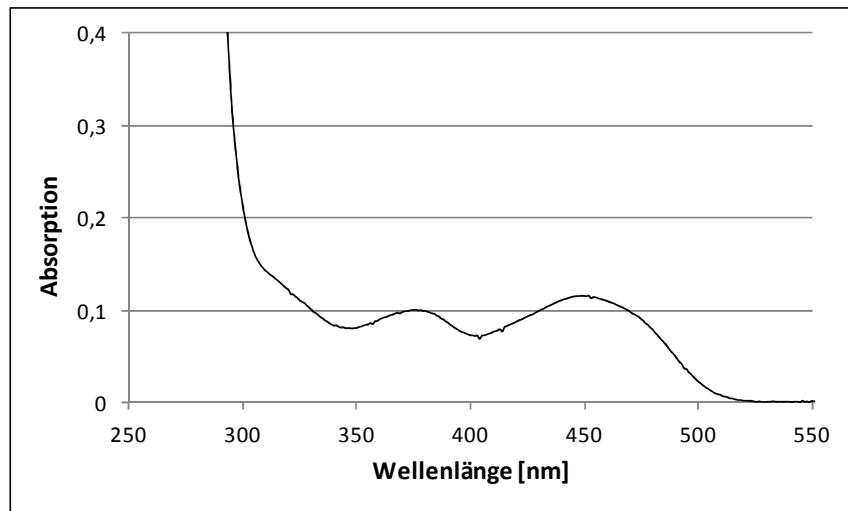


Abb. 36: UV/Vis-Spektrum des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins. Das Spektrum wurde vom gereinigten Protein mit einer Konzentration von $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$ ($16,4 \text{ }\mu\text{M}$ Elektronen-Transferierendes Flavoprotein) aufgenommen. Als Pufferpuffer diente 100 mM Tris/HCl pH 7,8 gegen den auch der Nullwert bestimmt wurde.

1.8.3 Photometrische Tests zur Bestimmung der Enzymaktivität des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *A. aromaticum*.

Als artifizielle Enzymaktivität des Proteins wurde die Oxidation von NADH mit Iodnitrotetrazoliumchlorid als Elektronenakzeptor mit Hilfe photometrischer Tests unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei 30°C bestimmt (Material und Methoden 9.2).

Bestimmung des apparenten V_{\max} - und K_m -Werts des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins.

Für die Bestimmung des apparenten V_{\max} - und K_m -Werts wurde NADH in Konzentrationen von $50 \text{ }\mu\text{M}$ bis 2 mM und Iodnitrotetrazoliumchlorid bei einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Die Proteinkonzentration des Enzyms betrug $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$. Die Messungen und anschließende Auswertung mit dem Graphikprogramm Prism 4.00 (GraphPad Software; La Jolla, Ca, USA) unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 2) ergaben einen apparenten K_m -Wert von $477,7 \pm 49,0 \text{ }\mu\text{M}$ und einen apparenten V_{\max} -Wert von $0,033 \pm 0,001 \text{ }\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ($R^2: 0,99$) (Abb. 37).

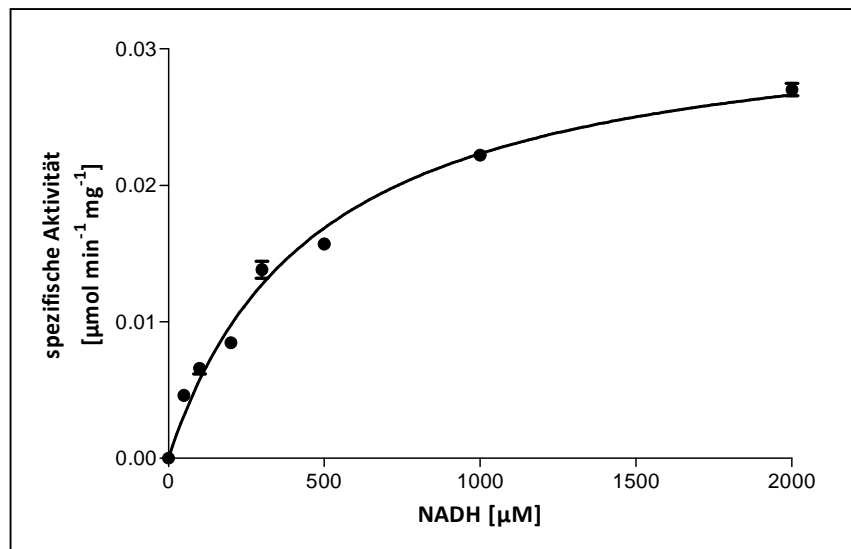


Abb. 37: Enzymkinetik des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins. Dargestellt sind Mittelwerte von drei voneinander unabhängigen Messungen. Die Ausgleichsgerade wurde durch die Verwendung der Datenpunkte in der Michaelis-Menten-Gleichung erstellt.

2. Potentielle Elektronen-Bifurkation in der Reaktion der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase

Für das Elektronen-Transferierende Flavoprotein aus *G. metallireducens* wurde untersucht, ob es sich um ein bifurkierendes ETF handelt. Dazu wurde getestet, ob das Enzym die Oxidation von NADH an die Reduktion von Ferredoxin koppeln kann (Vgl. Material und Methoden 9.3). Als Kontrolle diente das ETF aus *Acidaminococcus fermentans*, für das bereits gezeigt wurde, dass es zusammen mit der Butyryl-CoA Dehydrogenase Elektronen-Bifurkation katalysiert (Li, 2008). In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob Kombinationen aus unterschiedlichen Dehydrogenasen und ETFs zusammen interagieren und Aktivitäten messbar sind.

Im Bifurkations-Assay wurde in Gegenwart von Ferredoxin, einer Hydrogenase, NADH und unterschiedlichen ETFs mit entsprechenden Dehydrogenasen die NADH-Oxidation gemessen. Das *Geobacter*-ETF (ETF_G) zusammen mit der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *G. metallireducens* zeigte dabei keine Aktivität, während für die Reaktion des *Acidaminococcus*-ETF (ETF_A) und der Butyryl-CoA Dehydrogenase aus *A. fermentans* eine spezifische Aktivität von $0,22 \pm 0,04 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ gemessen wurde (Tab. 65).

Bei der Kombination von Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *G. metallireducens* mit dem ETF aus *A. fermentans* wurde im Bifurkations-Assay eine spezifische Aktivität von $0,007 \pm 0,001 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ gemessen und für die Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *T. aromatica* in Kombination mit dem ETF aus *A. fermentans* eine spezifische Aktivität von $0,006 \pm 0,001 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ gemessen. Bei den Kombinationen von Butyryl-CoA Dehydrogenase aus *A. fermentans* und den ETFs aus *G. metallireducens* oder *A. aromaticum* wurde keine spezifische Aktivität gemessen (Tab. 65). Die Kontrolle ohne (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase zeigte keine Aktivität.

Tab. 65: Kombination verschiedener ETFs und Acyl-CoA Dehydrogenasen. Gemessen wurde die Extinktionsabnahme bei 340 nm.

Acyl-CoA Dehydrogenase	ETF	Spezifische Aktivität
Benzylsuccinyl-CoA DH (<i>G. metallireducens</i>)	ETF (<i>G. metallireducens</i>)	<0,001 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
Butyryl-CoA DH (<i>A. fermentans</i>)	ETF (<i>A. fermentans</i>)	0,22 \pm 0,04 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
Benzylsuccinyl-CoA DH (<i>G. metallireducens</i>)	ETF (<i>A. fermentans</i>)	0,007 \pm 0,001 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
Butyryl-CoA DH (<i>A. fermentans</i>)	ETF (<i>G. metallireducens</i>)	<0,001 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
Benzylsuccinyl-CoA DH (<i>T. aromatica</i>)	ETF (<i>A. fermentans</i>)	0,006 \pm 0,001 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
Butyryl-CoA DH (<i>A. fermentans</i>)	ETF (<i>A. aromaticum</i>)	<0,001 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

3. Kristallisation und Strukturaufklärung des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens*

Zur genaueren Charakterisierung des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens* wurde das gereinigte Protein kristallisiert und anschließend mit Hilfe von Röntgenstrukturanalyse die Struktur gelöst. Da eine vollständige Lösung der Struktur mit nativen Kristallen und anschließendem „molecular replacement“ nicht möglich war, wurde eine vollständige Strukturlösung mit Hilfe von Schwermetall-Derivatisierung der Kristalle versucht. Da auch damit die Struktur nicht vollständig gelöst werden konnte, wurden Kristalle mit Proteinen angesetzt, in denen die Aminosäure L-Methionin durch L-Selenomethionin ersetzt wurde. Wie auch bei den Schwermetall-behandelten Kristallen wurde die kristallographische Phaseninformation mit Hilfe der MAD-phasing Methode (multiple anormale Dispersion) gewonnen.

Kristallisation des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins. Zunächst erfolgte ein erstes Screening mit 768 unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen (siehe Material und Methoden 13). Bereits hier entstanden Kristalle, die im späteren Verlauf für Messungen verwendet wurden. Mit Hilfe der Ergebnisse des ersten Screenings wurden die Bedingungen optimiert, bei denen ausreichend gute Kristalle entstanden waren (Tab. 66). Als weitere Optimierung wurde auf das sogenannte Seeding zurückgegriffen. Dabei wurden mit Hilfe eines Katzenhaars kleinste Bruchstücke von Kristallen des Elektronen-Transferierenden Flavoprotein in neue Bedingungen transferiert und dienten dort als Kristallisationskeim. Durch diese Technik wurde sowohl die Anzahl als auch die Qualität der Kristalle gesteigert (Abb. 37).

Tab. 66: Erfolgreiche Kristallisationsbedingungen des ersten Screenings. Hier werden im Überblick einige Kristallisationsbedingungen gezeigt, unter denen Kristalle beobachtet wurden. Die Inkubationstemperatur betrug jeweils 18°C.

Kristallisations Kit	Position	Bedingung
JCSG Corel Suite	D8	0,2 M Natriumsulfat; 20% (w/v) PEG 3350
	E7	0,2 M Calciumacetat; 0,1 M MES pH 6,0; 20% (w/v) PEG 8000
	F5	0,2 M Magnesiumchlorid; 20% (w/v) PEG 3350
JCSG Corell Suit	B3	0,2 M Calciumacetat; 0,1 M Imidazol pH 8,0; 10% (w/v) PEG 8000
	E4	1 M Lithiumchlorid; 0,1 M MES pH 6,0; 10% (w/v) PEG 6000
JCSG CorelllvSuit	G4	0,2 M Calciumchlorid; 20% (w/v) PEG 3350

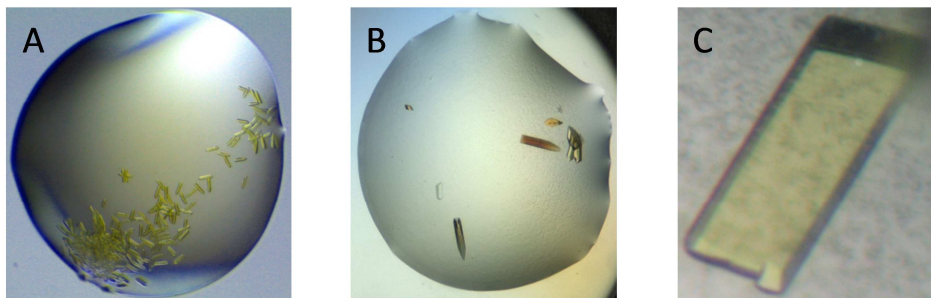


Abb. 37: Kristalle des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins. Zu sehen ist eine Auswahl an unterschiedlichen Kristallen. **A:** Kristalle bei 18°C, 2. Optimierung nach Seeding. **B:** Kristalle nach Screening bei 4°C in 0,1 M HEPES pH 7,0 + 20% PEG 6000. **C:** Kristall aus 2. Optimierung bei 4°C

Schwermetall-Soaking des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins. Die vorhandenen Kristalle wurden gepickt und dann unterschiedlich lang in Lösungen mit Schwermetallen inkubiert. Als Schwermetalle wurden Platin- und Quecksilber-Salze verwendet. In der Auswertung der Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse zeigte sich, dass die entsprechenden Schwermetalle an das Protein gebunden hatten. Aus den Datensätzen ging hervor, dass das Quecksilber mit den Cysteinen im Protein interagierte, von diesen aber lediglich drei im gesamten Heterodimer vorhanden sind. Das daraus resultierende anormale Signal reichte nicht für eine Phasierung der Proteinstruktur aus. Auch beim Platin zeigte sich das gleiche Problem. Das Verhältnis von gebundenen Platinatomen zur Gesamtmasse des Heterodimers war zu gering, um mit den erhaltenen Daten zu einer Lösung der Struktur zu kommen.

Produktion des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins mit L-Selenomethionin. Als weiterer Versuch zur Strukturlösung wurde Protein produziert, welches statt den normalen L-Methionin-Bausteinen L-Selenomethionine besitzt (Abb. 38). Dazu wurde die Überexpression in Minimalmedium vollzogen, zu dem ein Aminosäure-Mix und L-Selenomethionin zugegeben wurde. Der Einbau von Selenomethionin wurde anschließend mittels Elektrospray Ionisation Massenspektrometrie (ESI-MS) kontrolliert. Da in vorherigen Untersuchungen des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins mittels ESI-MS lediglich die α -Untereinheit als definierter Massenpeak zu erkennen war, während ein eindeutiger Peak der β -Untereinheit samt His-Tag nie zu erkennen war, konnte die Effizienz des Selenomethionin-Einbaus nur für die α -Untereinheit untersucht werden. Die Ergebnisse mit Selenomethionin-substituiertem Protein zeigten, dass L-Selenomethionin tatsächlich eingebaut wurde. Aus der Massenspektrometrie war deutlich zu erkennen, dass alle drei L-Methionine der α -Untereinheit überwiegend durch L-Selenomethionine ausgetauscht wurden. Außerdem waren auch kleinere Peaks zu erkennen, welche den Einbau von nur zwei oder einem Selenomethionin im Protein darstellten (Abb. 39). Mit Hilfe dieses Proteins wurde die Struktur des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens* gelöst (siehe Diskussion).

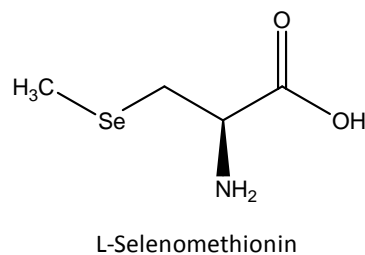


Abb. 38: Struktur von L-Selenomethionin.

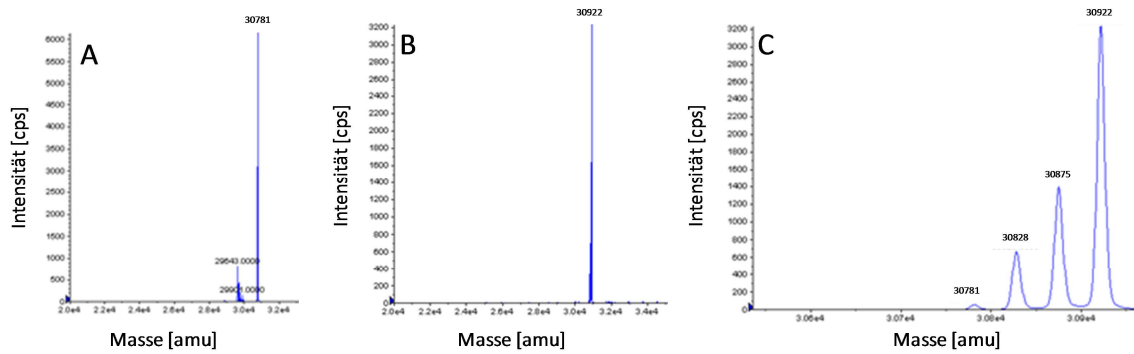


Abb. 39: Elektrospray Ionisation Massenspektrometrie (ESI-MS) des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins. Zu sehen sind die Massenpeaks der α -Untereinheit des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins mit und ohne L-Selenomethionin. Die Einheit der Ordinate ist in Impulse pro Sekunde (cps) angegeben, die Einheit der Abszisse in Atomare Masseneinheit (amu). **A:** Die Masse der α -Untereinheit im nativen Zustand. **B:** Die Masse der α -Untereinheit mit L-Selenomethionin. **C:** Genauere Auftrennung des Massenbereichs der α -Untereinheit. Der Massenunterschied von L-Selenomethionin zu L-Methionin beträgt 47 Da, woraus eine erwartete Masse der α -Untereinheit mit drei L-Selenomethioninen von 30922 Da resultiert.

VI. Diskussion

Der anaerobe Abbau von Toluol ist für das fakultativ anaerobe β -Proteobakterium *Thauera aromatica* bereits sehr gut untersucht (Leuthner et al., 1998; Rabus und Heider, 1998; Leutwein und Heider, 1999; Leuthner und Heider, 2000). Nach der Addition der Methylgruppe des Toluols an Fumarat, wird das Intermediat (*R*)-Benzylsuccinat anschließend über eine modifizierte β -Oxidation zu Benzoyl-CoA abgebaut. Die daran beteiligten Enzyme sind biochemisch weitgehend charakterisiert (Lippert, 2009; Leutwein, 2000). Der anaerobe Abbau von Toluol in den obligat anaeroben δ -Proteobakterien *Geobacter metallireducens* und *Desulfobacula toluolica* ist weniger gut untersucht. Diese Bakterien bauen Toluol unter Fe(III)- bzw. sulfatreduzierenden Bedingungen ab und synthetisieren ebenfalls in der Initialreaktion (*R*)-Benzylsuccinat aus Toluol und Fumarat (Rabus und Heider, 1998; Kane et al., 2002). Die Enzyme für den weiteren Abbau zu Benzoyl-CoA wurden in Organismen dieser physiologischen Gruppen bislang nicht charakterisiert. Aufgrund der ungünstigen energetischen Bedingungen beim Abbau von Toluol insbesondere unter sulfatreduzierenden Bedingungen muss ein modifizierter Abbauweg angenommen werden, der den Toluolabbau thermodynamisch ermöglicht. In diesem Zusammenhang sind insbesondere drei zusätzliche Gene (*etfB*, *etfA* und *orfX*) interessant, die im Genom von *Geobacter metallireducens* bereits seit längerer Zeit als zusätzliche Bestandteile des *bbs*-Operons für die Gene der β -Oxidation von Benzylsuccinat bekannt sind (Kube et al., 2004).

In dieser Arbeit wurden unter anderem die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenasen (BbsG) sowie Elektronen-Transferierende Flavoproteine (EtfBA) aus *D. toluolica* und *G. metallireducens* phylogenetisch und biochemisch charakterisiert und mit entsprechenden Enzymen aus denitrifizierenden toluolabbauenden Organismen verglichen. Außerdem wurde die Röntgen-Struktur des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens* gelöst und mit anderen Elektronen-Transferierenden Flavoproteinen verglichen.

1. Allgemeine Untersuchungen zum Toluolabbau durch *D. toluolica* und *G. metallireducens*

Das Bakterium *D. toluolica* Tol2 wurde unter sulfatreduzierenden Bedingungen auf Toluol bzw. auf Benzoat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen. Aufgrund der vergleichsweise langsamen Wachstumsrate dieses Stamms auf Toluol1 (t_D = 2,5 Monate) und des sehr geringen Wachstumsertrags von 42 mg Feuchtzellen pro Liter Kultur war eine biochemische Untersuchung des Zellextrakts oder die Reinigung nativer Enzyme nicht möglich. Zudem war die Genomsequenz dieses

Bakteriums zu Beginn der Arbeit nicht zugänglich. Aus diesem Grund wurde *G. metallireducens* als „Modellorganismus“ für strikt anaerobe Toluolabbauer verwendet, der eine hohe phylogenetische Ähnlichkeit zu *D. toluolica* aufweist und zudem Toluol mit deutlich höheren Wachstumsraten abbaut. *G. metallireducens* ist ebenfalls ein strikt anaerobes δ -Proteobakterium, das Toluol vollständig zu CO_2 oxidiert (Lovley et al., 1993). Dabei dient für gewöhnlich Eisen(III) als Elektronenakzeptor. In diesem Punkt zeigt sich eine Gemeinsamkeit von Eisen(III)- und Sulfatreduzierern, da beide Organismen-Typen bei der Reduktion ihres jeweiligen terminalen Elektronenakzeptors nur äußerst geringe Energieausbeuten erhalten. Das Redoxpaar Fe(III)/Fe(II) liegt zwar theoretisch bei einem elektrochemischen Standard-Potential von $E^{0'} = +770 \text{ mV}$, das ähnlich hoch liegt wie das von Wasser/Sauerstoff (Thauer et al., 1977). Jedoch liegt Fe(III) im Boden meist in Form von schwerlöslichen Fe(III) -Oxiden wie beispielsweise Ferrihydrit ($[\text{5Fe(III)}]_2\text{O}_3 \cdot 0,5 \text{ H}_2\text{O}$) vor, was wegen der niedrigen Konzentration von freiem Fe(III) (10^{-9} M bei pH 7, Chipperfield und Ratledge, 2000) zu deutlich niedrigeren tatsächlichen elektrochemischen Fe(III)/Fe(II) Potentialen von $E' = +78 \text{ mV}$ und weniger führt (Thamdrup, 2000).

Sulfat (SO_4^{2-}) ist mit einem elektrochemischen Standard-Potential von $E^{0'} = -217 \text{ mV}$ ($\text{SO}_4^{2-}/\text{HS}^-$) ein noch schlechterer terminaler Elektronenakzeptor als Fe(III) (Thauer et al., 1977). Bei der Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA zu (*E*)-Phenylitaconyl-CoA ($E^{0'} = 0 \text{ mV}$) müssen die Elektronen auf Sulfat ($E^{0'} = -217 \text{ mV}$) übertragen werden. Dies stellt eine thermodynamisch ungünstige Reaktion dar, die unter physiologischen Bedingungen nur schwer möglich ist. Betrachtet man die einzelnen Schritte der Sulfatreduktion genauer, sieht die Situation folgendermaßen aus: Zunächst kommt es zur Aktivierung des Sulfats zu Adenosin 5'-Phosphosulfat (APS) unter Verbrauch eines ATP (Meyer und Kuevert, 2007). Das elektrochemische Potential des Redoxpaares APS/HSO_3^- beträgt $\Delta E^{0'} = -60 \text{ mV}$. Auch hier zeigt sich noch ein thermodynamisches ungünstiges Verhältnis mit Elektronen aus der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA-Oxidation. Für Fe(III) -Reduzierer erscheint der Elektronentransfer vom Benzylsuccinyl-CoA zum Ferrihydrit zwar prinzipiell möglich, jedoch ist die Energieausbeute mit $\Delta G^{0'} = -15 \text{ kJ}$ sehr gering.

Offensichtlich gibt es in anaeroben Sulfatreduzierern und Eisenreduzierern einen zusätzlichen Schritt, der die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA-Oxidation energetisch begünstigt. Daran könnten die beiden Proteine EtfBA und OrfX beteiligt sein, die zusätzlich in den jeweiligen *bbs*-Operons dieser Bakterien kodiert sind. EtfBA dient dabei dem Elektronentransfer zwischen der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase und dem Quinonpool der Membran, wie aus *P. denitrificans* bekannt, wo reduziertes EtfBA durch eine membranständige ETF:Chinon-Oxidoreduktase umgesetzt wird (Vgl. Einleitung, Elektronen-Transferierende Flavoproteine). Eine solche „Standard“-ETF:Chinon-Oxidoreduktase (ETF-QO) ist allerdings im Wesentlichen auf fakultativ aerobe Bakterien beschränkt (z. B. *Aromatoleum*

aromaticum, Rabus et al. 2005) und weder im Genom von *G. metallireducens* noch in den bisher bekannten Genomen von sulfatreduzierenden Bakterien kodiert. Die Funktion der Elektronen-Weiterleitung von ETF in den Menachinon-Pool könnte bei den strikt anaeroben Bakterien deshalb vom Genprodukt von *orfX*-ähnlichen Genen übernommen werden. Dafür spricht auch die Tatsache, dass beispielsweise in *G. metallireducens* *orfX*-ähnliche Gene meistens benachbart zu *etfAB*-Genen auftreten (Vgl. Ergebnisse 1.1.3). Das Protein OrfX besitzt laut Analyse der Primärstruktur fünf oder sechs Transmembranhelices und zwei Motive für die Bindung von [4Fe4S]-Clustern (CxxCxxCxxx)C (Vgl. Ergebnisse 1.1.3). Im Gegensatz dazu weist die ETF-QO nur eine Transmembranhelix als Membran-Anker auf. Außerdem enthält die ETF-QO nur ein [4Fe4S]-Cluster auf der inneren Seite der Cytoplasmamembran (Usselman et al., 2008). Vermutlich spielt OrfX also eine wichtige Rolle bei der Energiekonservierung, möglicherweise ist das Protein in der Lage die Elektronen auf Menachinon zu übertragen, alternativ zur ETF-QO. Vielleicht kann auch durch die Transmembran-Domäne ein elektrochemisches Potential in Form eines Ionengradienten erzeugt oder genutzt werden, je nach energetischen Erfordernissen unter den jeweiligen Wachstumsbedingungen. Über die genaue Funktion des Proteins lässt sich mit den bisherigen Daten nur spekulieren.

Neben den physiologischen Gemeinsamkeiten gibt es zwischen *D. toluolica* und *G. metallireducens* auch genetische Übereinstimmungen. Mit Hilfe von Analysen der Aminosäuresequenz der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase und des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus dem *bbs*-Operon wurde jeweils ein phylogenetischer Stammbaum generiert (Abb. 40 und 41). Beide Stammbäume zeigen ein nahes Verwandtschaftsverhältnis von *G. metallireducens* zu *D. toluolica*, bei einer Sequenzidentität der Aminosäuresequenz der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenasen von 78% und der Elektronen-Transferierenden Flavoproteine von 63%. Beim Stammbaum der Elektronen-Transferierenden Flavoproteine lässt sich vermuten, dass es sich bei den Enzymen des oberen Teils (*C. kluyveri* bis *S. aciditrophicus*) um bifurkierende ETFs handelt und beim unteren Teil (*G. metallireducens* bis *P. denitrificans*) um nicht-bifurkierende ETFs.

Vergleicht man die *bbs*-Operons beider Organismen zeigt sich, dass zwar die Anordnung der Gene unterschiedlich ist, jedoch die drei zusätzlichen Gene *etfB*, *etfA* und *orfX* in beiden vorhanden sind (Ergebnisse 1.1.1).

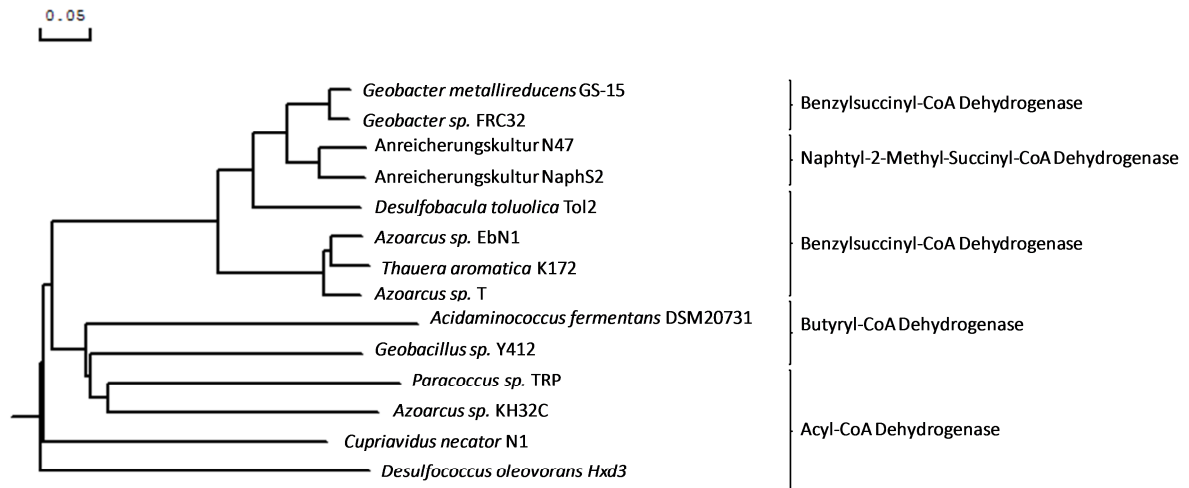


Abb. 40: Phylogenetischer Stammbaum der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase und verwandter Enzyme. Grundlage dieses Stammbaums ist die Aminosäuresequenz der unterschiedlichen Proteine.

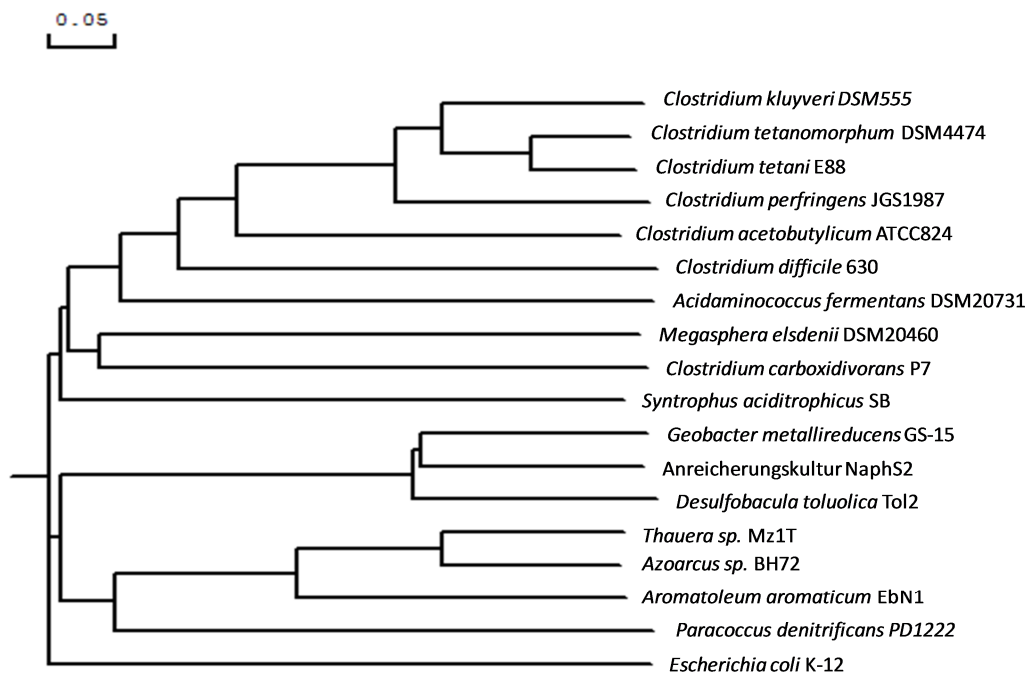


Abb. 41: Phylogenetischer Stammbaum des Elektronen-Transferierenden Flavoprotein. Grundlage dieses Stammbaums ist die zusammenhängende Aminosäuresequenz der α - und β -Untereinheit des ETF.

2. Wachstum von *G. metallireducens* auf Toluol und Benzoat

Als Kohlenstoff- und Energiequelle diente *G. metallireducens* entweder Toluol oder Benzoat. Als terminaler Elektronenakzeptor wurde Nitrat verwendet, welches vom Organismus zu Ammoniak reduziert wird (Lovley et al., 1993). Beim Vergleich des Wachstums von Zellen auf Toluol und Benzoat zeigte sich, dass die Kultur auf Benzoat eine deutlich höhere Wachstumsrate hatte und die stationäre Phase schneller (14-fach) erreichte. Benzoat wird mit Hilfe der Benzoat-CoA Ligase zu Benzoyl-CoA aktiviert (Wischgoll et al., 2005). Im Zellextrakt von *G. metallireducens*, der auf Toluol angezogen wurde, konnte Aktivität der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase gemessen werden. Dabei wurde kein Unterschied zwischen aeroben Bedingungen ($3,1 \pm 0,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) und anaeroben Bedingungen ($3,6 \pm 0,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) im Assay beobachtet. Im Vergleich zur berechneten Substrat-Umsatzrate für das Wachstum auf Toluol, welche mit Hilfe der gemessenen Wachstumsparametern berechnet wurden ($Q = 26 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), ist die gemessene spezifische Aktivität geringer (14% der erwarteten Umsatzrate). Ein Grund hierfür könnte einerseits in der späten Zellernte liegen oder andererseits in der Verwendung von artifiziellen Elektronenakzeptoren. Möglicherweise wurden in der stationären Phase die *bbs*-Operon kodierten Enzyme bereits teilweise degradiert. Somit war die Konzentration an (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase im Zellextrakt gering. Im Zellextrakt von Zellen, die auf Benzoat angezogen wurden, war keine (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase-Aktivität festzustellen. Die Expression der Proteine des *bbs*-Operons wurde nicht induziert. Vermutlich ist die Expression der Gene des *bbs*-Operons in *Geobacter* ähnlich reguliert wie den denitrifizierenden Bakterien *Aromatoleum aromaticum* EbN1 oder *Thauera aromatica* (Kühner et al., 2005; Leuthner und Heider, 2006).

Beim Vergleich des Wachstums auf Toluol mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an Nitrat (5 mM und 15 mM) zeigte sich für die Verdopplungszeit ein leichter Unterschied ($t_{D5\text{mM}} = 40$ Stunden und $t_{D15\text{mM}} = 63$ Stunden). Die Kultur mit 15 mM Nitrat wuchs etwas langsamer und bildete im Gegensatz zur anderen Kultur Nitrit. Dies wirkte sich negativ auf das Wachstum aus, da die Kultur nicht nur eine langsamere Wachstumsrate zeigte, sondern auch nach acht Tagen abzusterben begann. Scheinbar wird bei einer hohen Konzentration an Nitrat das zunächst produzierte Nitrit nicht mehr effektiv weiterreduziert und akkumuliert sich zu toxischen Konzentrationen.

3. (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase

Die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA zu (*E*)-Phenylitaconyl-CoA. Das heterolog produzierte Enzym aus *Thauera aromatica* wurde bereits biochemisch charakterisiert (Leuthner, 1999; Leutwein, 2000; Leutwein und Heider, 2002). In dieser

Arbeit wurden die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *D. toluolica* und *G. metallireducens* heterolog produziert, gereinigt, biochemisch charakterisiert und mit der aus *T. aromatica* verglichen (Tab. 67). Außerdem wurde der Zellextrakt aus *G. metallireducens* auf Aktivität der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase untersucht.

Für die rekombinante (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase wurde ebenfalls gezeigt, dass sie sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen aktiv ist und es dabei keine großen Unterschiede in der spezifischen Aktivität gibt. Jedoch zeigte das gereinigte Enzym bei längerer Lagerung, insbesondere bei -20°C, Aktivitätsverluste von über 50%. Möglicherweise war diese Tatsache auf den Verlust des Flavin-Kofaktors zurückzuführen, da durch Zugabe von FAD dieser Aktivitätsverlust verzögert wurde. Die Untersuchungen wurden mit frisch gereinigtem Enzym durchgeführt. Die UV/Vis-Spektren der einzelnen Enzyme zeigen ein charakteristisches Flavin-Spektrum mit Absorptionsmaxima um die 365 nm und 450 nm. Die Maxima sind nicht bei den exakten Wellenlängen lokalisiert, dies ist aber durch die Interaktion des Kofaktors mit dem Protein zu erklären.

Viele der bekannten Acyl-CoA Dehydrogenasen besitzen ein konserviertes Glutamat im aktiven Zentrum (Kim et al., 1993). Bei den mittelkettigen Acyl-CoA Dehydrogenasen (MCADH) beispielsweise ist dieses an Position 376 und bei den langkettigen Acyl-CoA Dehydrogenasen (LCADH) an Position 261 (Nandy et al., 1996). Untersuchungen haben gezeigt, dass dieses Glutamat nicht immer an genau derselben Position der Primärstruktur zu finden ist (Thorpe und Kim, 1995). Die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenasen aus *G. metallireducens*, *D. toluolica* und *T. aromatica* besitzen ebenfalls ein solches konserviertes Glutamat an Position 379. Diese Aminosäure spielt für die katalytische Aktivität des Enzyms vermutlich eine wichtige Rolle. In den strukturell charakterisierten initiiert sie einerseits als Base die α -H Abstraktion der α,β -Dehydrogenierung und stabilisiert andererseits über Wasserstoffbrückenbindung die Carbonyl-Gruppe des Acyl-Thioesters über das N-H Rückgrat (Nandy et al., 1996).

Die gemessenen apparenten V_{\max} -Werte waren bei allen drei charakterisierten Enzymen ähnlich. Sie waren etwa 200 fach höher als für die im Zellextrakt gemessene native (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *G. metallireducens*. Auch die apparenten K_m -Werte lagen in einem vergleichbaren Bereich. Der Vergleich mit Ergebnissen für die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *T. aromatica* aus einer früheren Arbeiten zeigt, dass auch hier der ermittelte apparente K_m -Wert ähnlich ist (Leutwein, 2000; Leutwein und Heider, 2002). Jedoch wurde in dieser Arbeit eine etwa zehnfach niedrigere spezifische Aktivität ermittelt. Ursache könnte hierfür die Verwendung von Enzym nach dem zweiten Chromatographieschritt sein, wohingegen in der zitierten Arbeit Protein

nach dem ersten Chromatographieschritt verwendet wurde. Der zusätzliche Reinigungsschritt war offensichtlich mit weiterem Aktivitätsverlust verbunden.

Neben der Hinreaktion wurde auch die Rückreaktion der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase untersucht. Die spezifische Aktivität der verwendeten Enzyme aus den drei unterschiedlichen Organismen war dabei um ein vielfaches höher als die der Hinreaktion (20 bis 50 fach). Die Kontrolle ohne Enzym zeigte keine Aktivität. In diesem Versuch wurde gezeigt, dass eine Synthese von (*R*)-Benzylsuccinat aus (*E*)-Phenylitaconat mit Hilfe der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase möglich ist. Die Rückreaktion wird offensichtlich von dem Enzym aus thermodynamischen Gründen favorisiert.

Die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *G. metallireducens* und *T. aromatica* wurde außerdem noch auf die Umsetzung weiterer Substrate untersucht. Dabei zeigte sich, dass in der Hinreaktion kein Butyryl-CoA und in der Rückreaktion weder Crotonyl-CoA noch (*E*)-3-Phenylacryl-CoA umgesetzt werden. Insbesondere (*E*)-3-Phenylacryl-CoA ist dem (*E*)-Phenylitaconyl-CoA strukturell sehr ähnlich. Offensichtlich ist das Enzym spezifisch für (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA und das Produkt. Dies konnte für die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *T. aromatica* für andere Substrate bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden (Leuthner, 1999; Leutwein, 2000; Leutwein und Heider, 2002). Für viele Acyl-CoA Dehydrogenasen ist bekannt, dass sie mehrere Substrate umsetzen. So kann beispielsweise die mittelkettige Acyl-CoA Dehydrogenase Hexanoyl-, Octanoyl- und Dodecanoyl-Kettige CoA-Ester umsetzen (Thorpe und Kim, 1995). Diese Substrate unterscheiden sich aber lediglich in der Länge der Fettsäurekette. Offensichtlich ist die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase sehr substratspezifisch.

Tab 67.: Eigenschaften rekombinanter (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase.

	<i>G. metallireducens</i>	<i>D. toluolica</i>	<i>T. aromatica</i>
Substrat	Benzylsuccinyl-CoA	Benzylsuccinyl-CoA	Benzylsuccinyl-CoA
Produkt	Phenylitaconyl-CoA	Phenylitaconyl-CoA	Phenylitaconyl-CoA
Kofaktor	FAD	FAD	FAD
Apparente V_{\max}	0,70 ± 0,04 μmol min ⁻¹ mg ⁻¹	0,39 ± 0,02 μmol min ⁻¹ mg ⁻¹	0,73 ± 0,06 μmol min ⁻¹ mg ⁻¹
Apparente K_m	97,9 ± 14,8 μM	85,3 ± 8,2 μM	139,7 ± 27,9 μM
Temperaturoptimum	50°C	n.b.	50°C
pH-Optimum	6,4	n.b.	8,0

4. Elektronen-Transferierendes Flavoprotein und Elektronen-Bifurkation

Die Elektronen-Transferierende Flavoproteine (ETFs) lassen sich grundsätzlich in drei Gruppen einteilen (Vgl. Einleitung). Das Elektronen-Transferierende Flavoprotein (ETF) aus *G. metallireducens* interagiert vermutlich mit der (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase, übernimmt die Elektronen und transferiert sie weiter über ein membranständiges Protein in den Menachinon-Pool. Neben dem ETF aus *G. metallireducens* wurden außerdem die rekombinanten ETFs aus *D. toluolica* und *A. aromaticum* Stamm EbN1 charakterisiert.

Anfangs wurde vermutet, dass es sich bei dem ETF aus *G. metallireducens*, welches im *bbs*-Operon codiert ist, um ein bifurkierendes ETF handeln könnte. Deshalb wurden die FAD-Kofaktoren genauer charakterisiert. Die Untersuchungen ergaben nach Rekonstitution des Proteins ein Verhältnis von einem Molekül FAD pro Heterodimer. Dies entspricht dem FAD-Gehalt der nicht-bifurkierenden ETFs aus Gruppe I, beispielsweise dem von *Paracoccus denitrificans* (Roberts et al., 1999). Sequenzanalysen zeigen, dass insbesondere der Carboxy-Terminus der α -Untereinheit des ETFs aus *G. metallireducens* hohe Sequenzidentität zu entsprechenden ETFs der Gruppe I besitzt. Dieser Bereich ist für die Interaktion des Proteins mit dem FAD verantwortlich (Roberts et al., 1996). Im Gegensatz dazu zeigt das ETF aus *Megasphaera elsdenii*, welches in Gruppe II eingeordnet wird, ein Verhältnis von zwei FAD pro Dimer (O'Neil et al. 1999). Für dieses ETF wurde erst vor kurzem bewiesen, dass es bifurkierende Eigenschaften besitzt (W. Buckel, pers. Mitteilung). Es wurde bereits früher die Hypothese aufgestellt, dass bifurkierende ETFs immer zwei FAD pro Dimer besitzen (Herrmann et al., 2008; Li et al., 2007). Beide FAD-Moleküle haben sehr unterschiedliche Redoxpotentiale durch die eine Bifurkation der Elektronen erst möglich wird.

Außerdem wurden in dieser Arbeit die apparenten K_m - und V_{max} -Werte der ETFs aus *G. metallireducens* und *A. aromaticum* für das Substrat NADH bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Enzym einen Transfer von Elektronen von NADH auf Iodonitrotetrazolium katalysiert. Die spezifische Aktivität der Reaktion war aber in beiden Fällen sehr gering. Im Vergleich dazu zeigte das bifurkierende ETF aus *Acidaminococcus fermentans* eine hundertfach höhere spezifische Aktivität für diese Reaktion. Bei bifurkierenden ETFs dient NADH natürlicherweise als Elektronendonator für die Reduktion des Substrats wie beispielsweise Crotonyl-CoA. Dabei werden die Elektronen vom FAD des ETFs auf das FAD einer Acyl-CoA Dehydrogenase transferiert, welche dann die Reduktion des Substrats katalysiert. Diese stark exergone Reaktion wird andererseits an die Reduktion von Ferredoxin durch Elektronen von NADH gekoppelt (Herrmann et al., 2008; Li et al., 2007). Bifurkierende ETFs müssen also eine Bindestelle für NADH besitzen. Zieht man in Betracht, dass die nicht-bifurkierenden ETFs aus den bifurkierenden ETFs hervorgegangen sind, so haben die nicht-bifurkierenden ETFs im Laufe der Evolution nicht nur die Eigenschaft verloren, ein zweites FAD zu

binden. Auch die Fähigkeit NADH zu binden und zu oxidieren ist aufgrund von Mutationen zurückgegangen oder abhanden gekommen. So kann die Tatsache, dass das ETF aus *G. metallireducens* NADH oxidiert möglicherweise als Artefakt betrachtet werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die spezifischen Aktivitäten von unterschiedlichen Acyl-CoA Dehydrogenasen in Kombination mit unterschiedlichen ETFs bestimmt. Es wurde einerseits untersucht, ob das ETF aus *G. metallireducens* zusammen mit der Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase Elektronen bifurkieren kann. Andererseits wurde getestet, ob sich allgemein ETFs und Acyl-CoA Dehydrogenase aus unterschiedlichen Organismen frei miteinander kombinieren lassen. Für das humane ETF wurde bereits gezeigt, dass das Enzym äußerst flexibel ist und mit diversen strukturell unterschiedlichen Dehydrogenasen interagieren kann (Toogood et al., 2004). Als bifurkierendes Enzym wurde das ETF aus *Acidaminococcus fermentans* zusammen mit der entsprechenden Butyryl-CoA Dehydrogenase als Positivkontrolle verwendet. Dafür wurde bereits Elektronen-Bifurkation nachgewiesen (Li, 2008). Im Versuch konnte gezeigt werden, dass es sich bei den ETF-Proteinen aus *G. metallireducens* und *A. aromaticum* jeweils nicht um bifurkierende ETFs handelt. Die Kombination aus Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase und ETF aus *G. metallireducens* zeigte keine Bifurkationsreaktion. Im photometrischen Assay konnten die Enzyme nicht Ferredoxin und Phenylitaconyl-CoA mit Hilfe von NADH reduzieren. Ebenso zeigte die Butyryl-CoA Dehydrogenase aus *A. fermentans* weder in Kombination mit dem ETF aus *G. metallireducens* noch mit dem ETF aus *A. aromaticum* eine Bifurkationsreaktion. Es ist bemerkenswert, dass bei Kombination des ETFs aus *A. fermentans* mit der Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase aus *G. metallireducens* oder *T. aromatica* Enzymaktivität gemessen wurde, die auf eine mögliche Bifurkation hindeutet. Diese war zwar in beiden Fällen deutlich niedriger als die der Positivkontrolle (3%), aber es wurde die Oxidation von NADH beobachtet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das ETF aus *A. fermentans* flexibel genug ist, um die Elektronen aus der NADH-Oxidation auf eine fremde Acyl-CoA Dehydrogenase zu übertragen und seine bifurkierende Eigenschaften beizubehalten. Eine mögliche Anwendung dafür wäre beispielsweise die biosynthetische Herstellung von (*R*)-Benzylsuccinat durch Umkehrung des β -Oxidationswegs. In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Reaktionen aller daran beteiligten Enzyme reversibel sind (Dellomonaco et al., 2011). Reines (*R*)-Benzylsuccinat ist für die chemische Industrie zur Herstellung von Polybutylenbenzylsuccinat von Interesse, einem biologisch abbaubaren Polymer (Xu und Guo, 2010).

5. Struktur des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens*

Mit Hilfe der Methode der Multiplen-Wellenlängen Anomalen Dispersion (MAD) mit Selenomethionin-substituiertem Protein konnte die Struktur des Elektronen-Transferierenden Flavoproteins aus *G. metallireducens* gelöst werden (Abb. 42). Dazu wurden die Daten der Röntgenstrukturanalyse des nativen Proteins mit denen des L-Selenomethionin-Derivats kombiniert und ausgewertet. Das Protein besteht wie alle bekannten ETFs aus drei Domänen (I-III). Domäne I und II sind dabei überwiegend der α -Domäne, III der β -Untereinheit zugeordnet. Domäne I und Domäne III zeigen untereinander eine nahezu identische Sekundär- und Tertiärstruktur, obwohl die Primärstruktur beider Domänen unterschiedlich ist. Beide Domänen sitzen sich antiparallel gegenüber und bilden den eher starren Teil des Enzyms, auf dem die Domäne II aufsitzt. Diese bindet ein Molekül FAD und ist über einen flexiblen „Linker“ mit der Domäne I verbunden (Toogood et al., 2007). Domäne III bindet ein Molekül AMP, dass keine katalytische Funktion besitzt, sondern nur eine strukturelle Rolle spielt (Roberts et al., 1996).

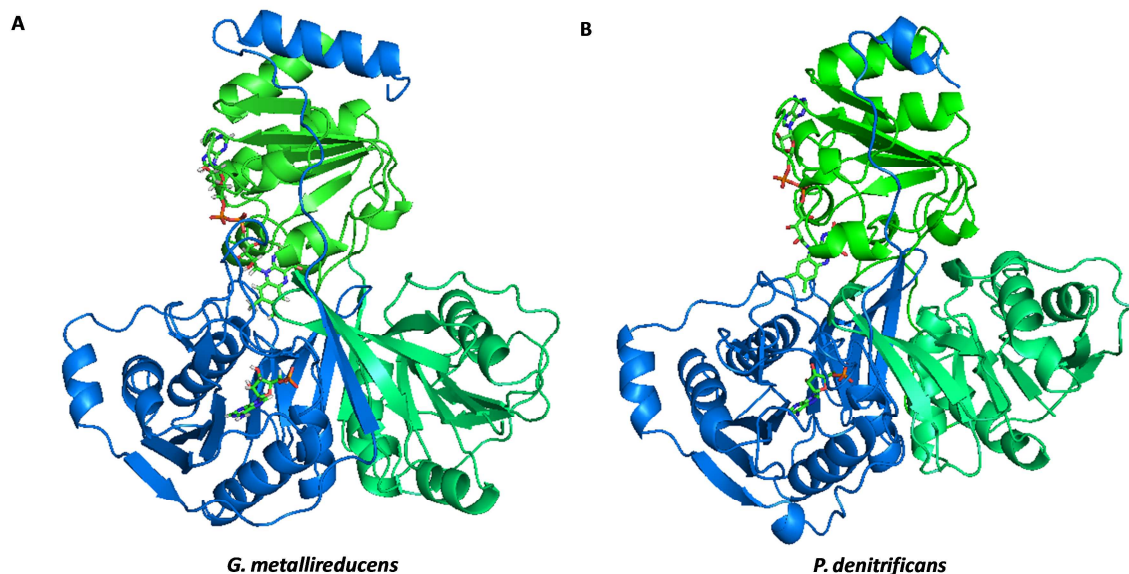


Abb. 42: Strukturen der ETFs aus *G. metallireducens* (A) und *P. denitrificans* (B). In blau ist jeweils die β -Untereinheit (Domäne III) mit dem gebundenen AMP abgebildet. In grün und türkis ist jeweils die α -Untereinheit (Domäne I in türkis, Domäne II in grün) abgebildet. Die Domäne II bindet das FAD.

Die gesamte Struktur zeigt eine sehr hohe Ähnlichkeit zu der des ETF aus *Paracoccus denitrificans*. Dies gilt dabei nicht nur für die Domänen II und III, die bereits eine relativ hohe Sequenzidentität besitzen (Domäne III = 32%, Domäne II = 53%), sondern auch für die Domäne I, die mit 20% eine eher

niedrige Sequenzidentität aufweist. Die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine sind fast identisch. Eine weitere strukturelle Gemeinsamkeit ist der sogenannte Erkennungsloop. Dieser ist Teil der Domäne III und in Abbildung 42 als freistehende α -Helix auf der linken Seite zu erkennen. Für *Methylophilus methylotrophus* konnte gezeigt werden, dass dieser Loop mit der Trimethylamin Dehydrogenase (TMDH) interagiert und dadurch beide Enzyme aneinander binden (Davidson et al., 1986). Obwohl das ETF aus *M. methylotrophus* zur Gruppe II ETFs gehört, weist die Aminosäuresequenz des Erkennungsloops hohe Sequenzidentität zum ETF aus *P. denitrificans* auf (Toogood et al., 2007). Der Loop besteht überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz des Erkennungsloops in *G. metallireducens* ist weniger gut konserviert. Dennoch sind hier ebenfalls überwiegend hydrophobe Aminosäuren vorhanden und auch die Sekundärstruktur zeigt hohe Ähnlichkeit. Vermutlich sind unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen allgemein an der Interaktion des ETF-Erkennungsloops mit Dehydrogenasen beteiligt. Der Erkennungsloop kann dann mit Aminosäuremotiven unterschiedlicher Dehydrogenasen interagieren, wodurch ein Elektronentransfer zwischen den Enzymen stattfinden kann. Dies würde erklären warum ETFs oft mit vielen unterschiedlichen Acyl-CoA Dehydrogenasen eine Bindung eingehen können.

Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem ETF aus *G. metallireducens*, das im *bbs*-Operon codiert ist, nicht um ein bifurkierendes ETF handelt. Es ist der Gruppe I ETFs zuzuordnen, zu der auch die ETFs aus *P. denitrificans* oder das humane ETF gehören. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass dieses ETF als Elektronenüberträger zwischen zwei Proteinen agiert, vermutlich der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase und OrfX.

VII. Literaturverzeichnis

Anderson R & Lovley D (2000) Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer. *Environmental Science & Technology* **34**: 2261-2266.

Andreoni V & Gianfreda L (2007) Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 287-308.

Arigoni F, Kaminski PA, Hennecke H & Elmerich C (1991) Nucleotide sequence of the fixABC region of *Azorhizobium caulinodans* ORS571: similarity of the fixB product with eukaryotic flavoproteins, characterization of *fixX*, and identification of *nifW*. *Mol Gen Genet* **225**: 514-520.

Bamforth S & Singleton I (2005) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **80**: 723-736.

Bedzyk L, Escudero K, Gill R, Griffin K & Frerman F (1993) Cloning, sequencing, and expression of the genes encoding subunits of *Paracoccus denitrificans* Electron-Transfer Flavoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 20211-20217.

Beller HR & Spormann AM (1997) Anaerobic activation of toluene and o-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J Bacteriol* **179**: 670-676.

Biegert T, Fuchs G & Heider J (1996) Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur J Biochem* **238**: 661-668.

Boll M (2005) Dearomatizing benzene ring reductases. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **10**: 132-142.

Boll M & Fuchs G (1995) Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism - ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *European Journal of Biochemistry* **234**: 921-933.

Boll M, Fuchs G & Heider J (2002) Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr Opin Chem Biol* **6**: 604-611.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Brockman HL & Wood WA (1975) Electron-transferring flavoprotein of *Peptostreptococcus elsdenii* that functions in the reduction of acrylyl-coenzyme A. *J Bacteriol* **124**: 1447-1453.

Caro Y, Masaguer CF & Ravina E (2003) Preparation of (R)-(-)- and (S)-(+)-3-hydroxymethyl-1-tetralone tosylates, key intermediates in the synthesis of new CNS drugs, via resolution of precursors. *Tetrahedron: Asymmetrie* **14**: 381-384.

Charlier L & Mazeau K (2012) Molecular modeling of the structural and dynamical properties of secondary plant cell walls: influence of lignin chemistry. *J Phys Chem B* **116**: 4163-4174.

Chipperfield JR & Ratledge C (2000) Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *Biometals* **13**: 165-168.

Chohan KK, Jones M, Grossmann JG, Frerman FE, Scrutton NS & Sutcliffe MJ (2001) Protein dynamics enhance electronic coupling in electron transfer complexes. *J Biol Chem* **276**: 34142-34147.

Clark WM (1961) Oxidation-Reduction Potentials of organic systems. *J Chem Educ* **38 (3)**: 158

Cologgi DL, Lampa-Pastirk S, Speers AM, Kelly SD & Reguera G (2011) Extracellular reduction of uranium via *Geobacter* conductive pili as a protective cellular mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 15248-15252.

Daeneke T, Kwon TH, Holmes AB, Duffy NW, Bach U & Spiccia L (2011) High-efficiency dye-sensitized solar cells with ferrocene-based electrolytes. *Nat Chem* **3**: 211-215.

Davidson VL, Husain M & Neher JW (1986) Electron transfer flavoprotein from *Methylophilus methylotrophus*: properties, comparison with other electron transfer flavoproteins, and regulation of expression by carbon source. *J Bacteriol* **166**: 812-817.

de Jong E, van Berkel WJ, van der Zwan RP & de Bont JA (1992) Purification and characterization of vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. A novel aromatic alcohol oxidase containing covalently bound FAD. *Eur J Biochem* **208**: 651-657.

Dellomonaco C, Clomburg JM, Miller EN & Gonzales R (2011) Engineered reversal of the b-oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals. *Nature* **476**: 355-359.

Edgren T & Nordlund S (2006) Two pathways of electron transport to nitrogenase in *Rhodospirillum rubrum*: the major pathway is dependent on the fix gene products. *FEMS Microbiol Lett* **260**: 30-35.

Eklund H & Fontecave M (1999) Glycyl radical enzymes: a conservative structural basis for radicals. *Structure* **7**: R257-262.

Evans WC & Fuchs G (1988) Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Annu Rev Microbiol* **42**: 289-317.

Fischer H (1994) Genetic-regulation of nitrogen-fixiation in rhizobia. *Microbiological Reviews* **58**: 352-386.

Foght J (2008) Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: Pathways and prospects. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **15**: 93-120.

Fuchs G, Boll M & Heider J (2011) Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nat Rev Microbiol* **9**: 803-816.

Gill D, Picou J & Ritchie L (2012) The Exxon Valdez and BP Oil Spills: A Comparison of Initial Social and Psychological Impacts. *American Behavioral Scientist* **56**: 3-23.

Goodman SI, Axtell KM, Bindoff LA, Beard SE, Gill RE & Frerman FE (1994) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding human electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase. *Eur J Biochem* **219**: 277-286.

Günther K, Schlosser D, Schmauder HP & Rausch U (1994) Bioremediation of contaminated groundwater. *Appl Biochem Biotechnol* **48**: 11-14.

Harwood C & Parales R (1996) The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annual Review of Microbiology* **50**: 553-590.

Harwood C, Burchhardt G, Herrmann H & Fuchs G (1998) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *Fems Microbiology Reviews* **22**: 439-458.

Hayaishi O (2008) From oxygenase to sleep. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 19165-19175.

Heider J (2001) A new family of CoA-transferases. *FEBS Lett* **509**: 345-349.

Heider J (2007) Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* **11**: 188-194.

Heider J & Fuchs G (1997) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur J Biochem* **243**: 577-596.

Heider J, Spormann AM, Beller HR & Widdel F (1998) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *Fems Microbiology Reviews* **22**: 459-473.

Herrick KR, Salazar D, Goodman SI, Finocchiaro G, Bedzyk LA & Frerman FE (1994) Expression and characterization of human and chimeric human-*Paracoccus denitrificans* electron transfer flavoproteins. *J Biol Chem* **269**: 32239-32245.

Herrmann G, Jayamani E, Mai G & Buckel W (2008) Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria. *J Bacteriol* **190**: 784-791.

Jones M, Basran J, Sutcliffe MJ, Günter Grossmann J & Scrutton NS (2000) X-ray scattering studies of *Methylophilus methylotrophus* (sp. W3A1) electron-transferring flavoprotein. Evidence for multiple conformational states and an induced fit mechanism for assembly with trimethylamine dehydrogenase. *J Biol Chem* **275**: 21349-21354.

Jones M, Talfournier F, Bobrov A, Grossmann JG, Vekshin N, Sutcliffe MJ & Scrutton NS (2002) Electron transfer and conformational change in complexes of trimethylamine dehydrogenase and electron transferring flavoprotein. *J Biol Chem* **277**: 8457-8465.

Kane SR, Beller HR, Legler TC & Anderson RT (2002) Biochemical and genetic evidence of benzylsuccinate synthase in toluene-degrading, ferric iron-reducing *Geobacter metallireducens*. *Biodegradation* **13**: 149-154.

Knappe J, Neugebauer FA, Blaschkowski HP & Gänzler M (1984) Post-translational activation introduces a free radical into pyruvate formate-lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1332-1335.

Kosaric N (2001) Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technology and Biotechnology* **39**: 295-304.

Kumar R, Singh S & Singh OV (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**: 377-391.

Kung JW, Löffler C, Dörner K, Heintz D, Gallien S, Van Dorsselaer A, Friedrich T & Boll M (2009) Identification and characterization of the tungsten-containing class of benzoyl-coenzyme A reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 17687-17692.

Lehman TC, Hale DE, Bhala A & Thorpe C (1990) An acyl-coenzyme A dehydrogenase assay utilizing the ferricenium ion. *Anal Biochem* **186**: 280-284.

Leuthner B & Heider J (1998) A two-component system involved in regulation of anaerobic toluene metabolism in *Thauera aromatica*. *FEMS Microbiol Lett* **166**: 35-41.

Leuthner B (2000) Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zum anaeroben Metabolismus von Toluol in dem denitrifizierenden Bakterium *Thauera aromatica*. Thesis

Leuthner B & Heider J (2000) Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatica*: the bbs operon codes for enzymes of beta oxidation of the intermediate benzylsuccinate. *J Bacteriol* **182**: 272-277.

Leuthner B, Leutwein C, Schulz H, Hörth P, Haehnel W, Schiltz E, Schägger H & Heider J (1998) Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycy radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol Microbiol* **28**: 615-628.

Leutwein C & Heider J (1999) Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying *Thauera aromatica*: activation and beta-oxidation of the first intermediate, (R)-(+)-benzylsuccinate. *Microbiology* **145** (Pt 11): 3265-3271.

Leutwein C (2000) Biochemische Untersuchungen zum anaeroben Toluol-Stoffwechsel. Thesis

Leutwein C & Heider J (2001) Succinyl-CoA:(R)-benzylsuccinate CoA-transferase: an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway in denitrifying bacteria. *J Bacteriol* **183**: 4288-4295.

Leutwein C & Heider J (2002) (R)-Benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase of *Thauera aromatica*, an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway. *Arch Microbiol* **178**: 517-524.

Lewis NG & Yamamoto E (1990) Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**: 455-496.

Li F, Hinderberger J, Seedorf H, Zhang J, Buckel W & Thauer RK (2008) Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*. *J Bacteriol* **190**: 843-850.

Lippert ML (2009) Biochemie von Enzymen des anaeroben Stoffwechsels von Toluol in *Thauera aromatica*. Thesis

Lovley D, Phillips E, Gorby Y & Landa E (1991) Microbial reduction of uranium. *Nature* **350**: 413-416.

Lovley DR & Phillips EJ (1986) Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl Environ Microbiol* **51**: 683-689.

Lovley DR, Giovannoni SJ, White DC, Champine JE, Phillips EJ, Gorby YA & Goodwin S (1993) *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch Microbiol* **159**: 336-344.

Mayhew SG, Whitfield CD, Ghisla S & Schuman-Jörns M (1974) Identification and properties of new flavins in electron-transferring flavoprotein from *Peptostreptococcus elsdenii* and pig-liver glycolate oxidase. *Eur J Biochem* **44**: 579-591.

Meyer B & Kuever J (2007) Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes--origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology* **153**: 2026-2044.

Migaud M, CheeSanford J, Tiedje J & Frost J (1996) Benzylfumaric, benzylmaleic, and Z- and E-phenylitaconic acids: Synthesis, characterization, and correlation with a metabolite generated by *Azoarcus tolulyticus* Tol-4 during anaerobic toluene degradation. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 974-978.

Mullis KB & Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.

Nandy A, Kuchler B & Ghisla S (1996) Molecular evolution and substrate specificity of acyl-CoA dehydrogenases: chimaeric "medium/long" chain-specific enzyme from medium-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Biochem Soc Trans* **24**: 105-110.

Novaes E, Kirst M, Chiang V, Winter-Sederoff H & Sederoff R (2010) Lignin and biomass: a negative correlation for wood formation and lignin content in trees. *Plant Physiol* **154**: 555-561.

O'Neill H, Mayhew SG & Butler G (1998) Cloning and analysis of the genes for a novel electron-transferring flavoprotein from *Megasphaera elsdenii*. Expression and characterization of the recombinant protein. *J Biol Chem* **273**: 21015-21024.

Pace CP & Stankovich MT (1987) Redox properties of electron-transferring flavoprotein from *Megasphaera elsdenii*. *Biochim Biophys Acta* **911**: 267-276.

Peters F, Shinoda Y, McInerney MJ & Boll M (2007) Cyclohexa-1,5-diene-1-carbonyl-coenzyme A (CoA) hydratases of *Geobacter metallireducens* and *Syntrophus aciditrophicus*: Evidence for a common benzoyl-CoA degradation pathway in facultative and strict anaerobes. *J Bacteriol* **189**: 1055-1060.

Rabus R & Widdel F (1995) Conversion studies with substrate analogues of toluene in a sulfate-reducing bacterium, strain Tol2. *Arch Microbiol* **164**: 448-451.

Rabus R & Widdel F (1996) Utilization of Alkylbenzenes during Anaerobic Growth of Pure Cultures of Denitrifying Bacteria on Crude Oil. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1238-1241.

Rabus R & Heider J (1998) Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate reducing bacteria. *Archives of Microbiology* **170**: 377-384.

Rabus R, Kube M, Heider J, Beck A, Heitmann K, Widdel F & Reinhardt R (2005) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* **183**: 27-36.

Reddy D, Lancaster JR & Cornforth DP (1983) Nitrite inhibition of *Clostridium botulinum*: electron spin resonance detection of iron-nitric oxide complexes. *Science* **221**: 769-770.

Roberts DL, Frerman FE & Kim JJ (1996) Three-dimensional structure of human electron transfer flavoprotein to 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14355-14360.

Roberts DL, Herrick KR, Frerman FE & Kim JJ (1995) Crystallization and preliminary X-ray analysis of electron transfer flavoproteins from human and *Paracoccus denitrificans*. *Protein Sci* **4**: 1654-1657.

Roberts DL, Salazar D, Fulmer JP, Frerman FE & Kim JJ (1999) Crystal structure of *Paracoccus denitrificans* electron transfer flavoprotein: structural and electrostatic analysis of a conserved flavin binding domain. *Biochemistry* **38**: 1977-1989.

Rockne K & Strand S (1998) Biodegradation of bicyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in anaerobic enrichments. *Environmental Science & Technology* **32**: 3962-3967.

Samanta SK, Singh OV & Jain RK (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol* **20**: 243-248.

Sato K, Nishina Y & Shiga K (1993) Electron-transferring flavoprotein has an AMP-binding site in addition to the FAD-binding site. *J Biochem* **114**: 215-222.

Sato K, Nishina Y & Shiga K (2003) Purification of electron-transferring flavoprotein from *Megasphaera elsdenii* and binding of additional FAD with an unusual absorption spectrum. *J Biochem* **134**: 719-729.

- Scott JD & Ludwig RA (2004)** *Azorhizobium caulinodans* electron-transferring flavoprotein N electrochemically couples pyruvate dehydrogenase complex activity to N₂ fixation. *Microbiology* **150**: 117-126.
- Smith MR (1990)** The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation* **1**: 191-206.
- Spormann AM & Widdel F (2000)** Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**: 85-105.
- Studier FW (2005)** Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**: 207-234.
- Taylor BF & Heeb MJ (1972)** The anaerobic degradation of aromatic compounds by a denitrifying bacterium. Radioisotope and mutant studies. *Arch Mikrobiol* **83**: 165-171.
- Schink B (2000)** *Advances in Microbial Ecology*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
- Tauer RK, Jungermann K & Decker K (1977)** Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* **41**: 100-180.
- Thorpe C & Kim JJ (1995)** Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases. *FASEB J* **9**: 718-725.
- Toogood HS, Leys D & Scrutton NS (2007)** Dynamics driving function: new insights from electron transferring flavoproteins and partner complexes. *FEBS J* **274**: 5481-5504.
- Toogood HS, van Thiel A, Scrutton NS & Leys D (2005)** Stabilization of non-productive conformations underpins rapid electron transfer to electron-transferring flavoprotein. *J Biol Chem* **280**: 30361-30366.
- Toogood HS, van Thiel A, Basran J, Sutcliffe MJ, Scrutton NS & Leys D (2004)** Extensive domain motion and electron transfer in the human electron transferring flavoprotein.medium chain Acyl-CoA dehydrogenase complex. *J Biol Chem* **279**: 32904-32912.

White HK, Hsing PY, Cho W, Shank TM, Cordes EE, Quattrini AM, Nelson RK, Camilli R, Demopoulos AW, German CR, Brooks JM, Roberts HH, Shedd W, Reddy CM & Fisher CR (2012) Impact of the Deepwater Horizon oil spill on a deep-water coral community in the Gulf of Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Widdel F & Rabus R (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol* **12**: 259-276.

Wischgoll S, Heintz D, Peters F, Erxleben A, Sarnighausen E, Reski R, Van Dorsselaer A & Boll M (2005) Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of *Geobacter metallireducens*. *Mol Microbiol* **58**: 1238-1252.

Wohlfarth G & Buckel W (1985) A sodium ion gradient as energy source for *Peptostreptococcus asaccharolyticus*. *Arch Microbiol* **142**: 128-135.

Zhang J, Frerman FE & Kim JJ (2006) Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16212-16217.

VIII. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Å	Angström
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
As	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Bbs	β-Oxidation von Benzylsuccinat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Bss	Benzylsuccinat-Synthase
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad-Celsius
CoA	Coenzym A
C-Terminal	Carboxyterminal
D	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphate
ε	Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	fast performance liquid chromatography
g	Erdbeschleunigung
λ	Wellenlänge

HPLC	hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Konstante
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NMR	Kernspinresonanz
N-Terminal	Aminoterminal
OD	optische Dichte
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RP	reversed phase
RT	Raumtemperatur
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV/Vis	ultra violet/visible
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

IX. Anhang

1. Sequenzierung *bssD* aus *D. toluolica* Tol2

```

1      ATGTGTATAA AAAATCACCC AAAAATTCTT CTTATTACCG AAATCCAAAAG GTTTTGCTTG
61     CAGGATGGCC CCGGTTTCAG GACAACCATA TTTTAAAAAG GGTGTCCTTT GCACTGCCCT
121    TGGTGCCATA ATCCAGAAAC CCAGAGTCCG AAAAAAGAAT TCTACTATTA TCCTGAAAAA
181    TGTTCAAACT GCGGCCGGTG CGCGAAGAGT TGTCCCACCG GTGCCTCCAC AATGAAAATC
241    GGGACTGATA ATACCCCTGT TCTTGATCTT GATCGCAGTA AATGCATAGC GTGCATGCAA
301    TGTGTTGATG CCTGTTTATC AAGTGCAAGA GCTGTCGTCG GGCAAAAATCT CACAATTGAT
361    ACAATTATGG AGGAGGCGTT GGCTGACCAA CCTTTTTTTT AAAATAGCGG GGGGGGCGTC
421    ACCATCAGTG GAGGAGATCC TTTATTGTTT CCGGATTTTA CCCTTGAAAT GGTAAAAACG
481    CTAAAGAAAG AGGGTCTTCA TGTTGCCATT GAAACCAGTT GTTTTCAAAA ATGGGACAAA
541    ATTCGCCCCCT TGTTAAGCTA TGTGGATCTG TTTCTTGTGG ACATTAAGTC TCTCATTTCA
601    AAAAAACATA AAATCGTCGT AGGATGGCCG TTGGAACCTA TCCTTGAAAA TATCAAGAAC
661    CTCATAGAAA AAAATGCAAA TCTGAGAATC CATCTGCCGA TTATTCCAAA TTTTAATGAT
721    TCCATGGATG ATTTTAAAAC CTGTGAAATT TTTTAAAGCC GGATTGCCGA TCGGCTCATG
781    GCGGTAGATA TTCTTCCCTA CCATGTTTAC GGGGAAGGAA AATACAATTT CCTTGGCCGT
841    CATGACGCCT ATGCTTGCAA GGATGTAAAA CAATCACCGT CCGAAAAAGAT AGAACCTCTG
901    GTCAAAGCCT TGAAGCGATT ACATATAAAG GATTTGAGCG TCGGTGGCTT AGTGGGTATG
961    GGAGGCTATT CAGGGGAAAA ATCTAAAAAA GGCTTGTGA

```

2. Sequenzierung *bssB* aus *D. toluolica* Tol2

```

1      ATGAGCGTAG TTAAAACTCA ACTTTACATG GAAAAAGACA CAAAAAACC TTGCAGGAGT
61     TGCAAGTGGG AGATTGCAGA CCCACAAAT CCCGATCAGG GTCAATGCAC GGTTAACAGA
121    ACCAGTGCCG GAGCGGTTTG GAAACGATGG GTCAGGGATG TTCATAATAT GACATGCTCT
181    CGCCATGAAG AAGGAAAATT GAGCTTCAGG GAACATGTAT AA

```

3. Sequenzierung *bssC* aus *D. toluolica* Tol2

```

1      ATGTCTAAAT GTGAAAGTTG TAAATTTTTC ATTTCGAGTTC CAAATGATGC CGATGATTTC
61     GAGCCTGGCA AGGGAGATTG CATTACCGAG GTAAAGGATG AAAAAAGCAA ATACTGGTTA
121    TCAACGCCCC TATTTTCAGGA CACAGATGCC TGCCCGAATT TCAACAAAGC AATTTAA

```

4. Sequenzierung *bbsA* aus *D. toluolica* Tol2

```

1      ATGGCTGAAA AAAAGAAAAC CAAAAAGAG AAAGAGCCGG ATATCACATT TTATCATCCG
61     GATTTGCTTG AGATTCCCGA AAACGGATTG CCGTACCTTA AGGGGTATAA ATGCAGAAAA
121    TGTGGTCAGC TTGATTTTCC CAAATTAACC CCTTGCCCCA CCTGCTGGGG AGAGGACTTC
181    GATGTGGTTC CCTTGTCCAG AAAGGGAATT TTGTACAGTT TTTCCGACCT TTATATCGGC
241    CAGCCCGGTA TGGCAACCCC CTATATTTGC GGCTATATTG ATCTGCCGGA AGATATCAGA
301    ATTTTGGCCA TGCTGAAAGG AGATGTCAAT ACCTTTAAAT GTGACGAAGA AGTCGAATTG
361    ACAACGGGTC CGATAAGGAA GAATGCAGAT GGTCTTCCAA TTATCAGTTA CATGTTCCAG
421    AAAGTATAG

```

5. Sequenzierung bbsB aus *D. toluolica* Tol2

1	ATGAGATTAC	AGCGAGATGT	ATATATAGCC	GGAGTAGGTG	AGACTGTTTT	TGGCAGACAT
61	AAAATGGATT	ACGATGAACT	GGGACGTATG	GCAGCTTTTC	AGGCAATCAA	ATCTTCCAAT
121	ATTGAAGGAC	CGGGGATGAT	TGAGAGTGCC	TATGTGGGTA	ATGCCACTAA	CGGTATCGTT
181	ACCGGGCAGA	CTATTTTTAA	AGACATCGGT	ATCTGCGGAA	CCGCTCCCAT	CATCAATGTG
241	GAAAGTGCCT	GTTTCGGCCG	TGCTATGGCA	GTCCATCTGG	CCATAAAAGA	TGTGGCCTGC
301	GGGCTGACGG	AATTATCCAT	GGGCGTGGGG	GCTGAAAATC	ATACTCTTCA	CAGAGAAGCG
361	GGTACGGCAT	TCCAGCCGGC	AATGAACGAT	ATTGAAGCCG	TCCACGGTGG	GGTTATGACC
421	GGTAAATATG	CCATGCGCGC	GACCCGGTAT	ATGCACGAGA	CCGGTGCCAC	TATTGAAGAT
481	CTGGCTTTGA	TCACCCAGAA	AAGCAAGCGG	CACGCCAAAA	ATAATCCTTA	TGCCCTTTT
541	GGGGGGGATT	ACAGTATTGA	GGAAATTATT	AATTCAAGAA	TGGTGGCCTA	TCCTCTGACG
601	CTTCATCAGT	GTTGTGGAAT	CGTTGATGGT	GCAGGTGCTG	TCGTGGTCTG	TTCCGAGGAA
661	ATGATCAAAA	AACTGGGGAT	TAAAAAACCG	GTTAAAGTAA	GAGGGTCCGT	TGTGACATCC
721	GGTCCGTATC	ATAACCGGCC	AAGGGACATT	ACCGGTGATG	ATATCACTGA	AATGACATCT
781	GAAATGCTCT	ATGAGGAATC	CGGAATCGGC	CCCAAAGACG	TTGATATCCT	GGAATTGCAT
841	GATGCCTTTA	CCATTGCTGA	GTTGCTTTAT	TATGAATGCA	TGCAGCTGTG	TGACAAAGGG
901	GATGGCCTGA	AATTTTTGAG	AGACGGTCAG	TCAACCTATG	GCGGGCAGTG	CGTTGTCAGT
961	CCCAGGGGCG	GAATGCTGTC	CTATGGTCAT	CCCATCGGTG	CTTCAGGTGC	GGCCAGGTA
1021	GCAGCCCAGG	TAAAACAAC	CAGGGGAGAG	TGTCAGGGCT	ACCAGGTAGA	GCCGATTCCA
1081	AAGGTTGCCA	TGACCCATGT	AACCGGCGGC	GGTCTTTCTG	GTAAGAACA	TGCGGCCTGT
1141	ACAATGCATA	TGCTCACAAG	TGATTGGTAG			

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Johann Heider für die Bereitstellung des interessanten Themas und der Möglichkeit, dieses in seiner Arbeitsgruppe zu bearbeiten danken. Außerdem danke ich dir für deine wertvollen Ratschläge, deine Geduld, für jegliche Unterstützung und die anregenden Diskussionen. Dies alles hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Wolfgang Buckel für die Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens. Außerdem danke ich Ihnen ganz herzlich für die vielen Ratschläge, Tipps und Informationen während meiner gesamten Zeit am Fachbereich.

Außerdem danke ich dem gesamten Arbeitskreis von Prof. Essen für die freundliche Atmosphäre wenn immer ich mal wieder vor Ort war. Besonders danken möchte ich Stephan Kiontke, Petra Gnau und Dr. Holger Steuber für all die Mühen und Unterstützung.

Prof. Ralf Rabus danke ich für die Bereitstellung der genetischen Informationen von *Desulfobacula toluolica*.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Boll und im Besonderen Dr. Simon Wischgoll danke ich für die Bereitstellung der Zellen von *Geobacter metallireducens* und die viele Hilfe.

Bei Dr. Karole Schühle bedanke ich mich dafür, dass du bei Fragen immer ein offenes Ohr hattest und außerdem auch immer die passende Antwort dazu. Alles wird gut.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Patricia Wagner. Danke, dass du auch in hektischen Momenten immer da warst und immer geholfen hast. Danke für die all die Unterstützung in fünf Jahren am Fachbereich.

Ebenso danke ich meinen Kollegen, Weggefährten und Freunden Dr. Markus Hilberg, Dr. Michael Schick, Daniel Knack und Marco Hornung für die tolle Zeit und die unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Prof. Heider, Prof. Buckel und Prof. Bremer danke ich für die angenehme Atmosphäre und unentwegte Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie danke ich außerordentlich für all die Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Datum)

(Unterschrift)

Lebenslauf

Name: Sebastian Kölzer

Geburtsdatum: 03. April 1978

Geburtsort: Weilburg

Schulbildung

1988 – 1994 Realschule Rennerod

1999 – 2001 Siegerland Kolleg mit dem Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Ausbildung

1994 – 1997 Staatliche Glasfachschule Hadamar mit dem Abschluss des Glasapparatebauer-Gesellen

Ersatzdienst

1997 – 1998 Rettungshelfer beim Deutschen Roten Kreuz in Hachenburg

Hochschulbildung

2002 – 2007 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg

Prüfungsfächer: Mikrobiologie, Genetik, Virologie

2007 – 2008 Diplomarbeit am Fachbereich Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Buckel zum Thema:

Aufreinigung und Charakterisierung des Butyryl-CoA Dehydrogenase/ETF Komplex aus *Clostridium tetanomorphum*

Promotion

2008 – 2012 Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Johann Heider zum Thema:

Untersuchungen zum anaeroben Toluol-Stoffwechsel in fakultativ und obligat anaeroben Bakterien